

基于固体电极修饰的 DNA 电化学生物传感器研究

摘要

本论文分三部分,第一部分合成了一种电活性配合物,并且用此配合物作为指示剂发展了一种新型的电化学 DNA 传感器;第二部分和第三部分发展了两种无指示剂的 DNA 传感器。

1、合成了硝酸二水·双 *N*-(2-吡啶甲基)苯甲酰胺合镉(II) (简称为 $[\text{CdL}_2]^{2+}$) 配合物,通过 X-单晶衍射法表征了配合物的结构,用电化学和荧光的方法研究了此配合物与 dsDNA 的相互作用机理。结果表明 $[\text{CdL}_2]^{2+}$ 在玻碳电极上有很好的电化学活性并且与 dsDNA 发生了嵌插结合作用。在 0.2 mol L^{-1} NaAc-HAc (pH 7.02) 介质中, $[\text{CdL}_2]^{2+}$ 与 dsDNA 形成的复合物的结合比为 2:1,结合常数为 $25.56 \text{ L}^{1/2} \text{ mol}^{-1/2}$ 。以 $[\text{CdL}_2]^{2+}$ 为指示剂制备了一种检测乙肝病毒 (HBV) 的新型的电化学传感器。将 21 个碱基序列的 HBV 单链寡核苷酸 (HBV-ssDNA) 通过共价键合作用固定到玻碳电极上,与其互补序列单链 DNA 进行杂交,杂交信号通过微分脉冲的方法 (DPV) 进行表征。此 DNA 传感器对目标 HBV-ssDNA 的检测范围为 $1.01 \times 10^{-8} \sim 1.62 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 相关系数为 0.9962, 检测限为 $7.19 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($3\sigma, n = 11$)。

2、制备了一种新型的用 2-巯基苯并噻唑 (MBT) 自组装金电极检测目标 ssDNA 的电化学生物传感器。因为 MBT 可以嵌插入 dsDNA 的双螺旋之中,所以可以用 Au-MBT 选择性的区分 ssDNA 和 dsDNA,通过扫描电镜和循环伏安的方法预先表征了 Au-MBT 的组装情况。在过量的探针 ssDNA 和适量的目标 ssDNA 的杂交溶液中,以组装电极为工作电极通过 DPV 表征了 DNA 的杂交情况。发现目标 ssDNA 的浓度与还原峰电流有一定的线性关系。此传感器对目标 ssDNA 的检测范围为 $1.59 \times 10^{-8} \sim 2.4 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 检测限为 $2.38 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($3\sigma, n = 11$)。Au-MBT 电极具有良好的重现性和再生性,在 10 次检测/再生的循环过程中,峰电流信号没有明显的变化。此种传感器制备方便,价格低廉,在连续和定量检测实际的生物样品中目标 ssDNA 方面具有很大的发展潜力。

3、制备了一种用 2-巯基苯并咪唑 (MBI) 自组装金电极检测目标 ssDNA 的电化学生物传感器。与第二部分不同的是,利用 Au-MBI 检测时,首先用固定了探针 ssDNA 的玻碳电极将目标 ssDNA 从样品中分离出来,然后将目标 ssDNA 转移到新的溶液中再用组装电极检测杂交情况,此传感器对目标 ssDNA 的检测范围为 $1.32 \times 10^{-8} \sim 1.59 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 检测限为 $4.58 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

关键词： 电化学 DNA 生物传感器，伏安法，镉配合物，2-巯基苯并噻唑，2-巯基苯并咪唑

STUDY OF DNA ELECTROCHEMICAL BIOSENSOR BASED ON SOLID ELECTRODES

ABSTRACT

There are three parts in this paper, an electroactive complex was synthesized in the first part and this complex was used as indicator to develop a novel electrochemical DNA biosensor; we also developed two label-free DNA biosensors in the second part and third part.

1. The complex diaquabis[*N*-(2-pyridinylmethyl) benzamide- κ^2 *N,O*]-cadmium(II) dinitrate $\{[\text{CdL}_2(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_2$, where *L* = *N*-(2-pyridinylmethyl) benzamide} was synthesized and characterized by x-ray diffraction analysis. Fluorescence spectroscopy and voltammetry were used to probe the interaction between $[\text{CdL}_2]^{2+}$ and salmon sperm DNA. Results showed that $[\text{CdL}_2]^{2+}$ had excellent electrochemical activity on glassy carbon electrode (GCE) and could intercalate into the double helix of double-stranded DNA (dsDNA). In $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAc-HAc media (pH 7.02), the binding ratio between $[\text{CdL}_2]^{2+}$ and salmon sperm DNA was calculated to be 2:1 and the binding constant was $25.56 \text{ L}^{1/2} \text{ mol}^{-1/2}$. An electrochemical DNA biosensor for the detection of human hepatitis B virus (HBV) DNA fragment was developed. The biosensor relied on the covalent immobilization of the 21-mer single-stranded DNA (ssDNA) related to HBV gene on the modified glassy carbon electrode (GCE). Using $[\text{CdL}_2]^{2+}$ as novel electroactive indicator, the hybridization between the probe and its complementary ssDNA, as the target, was investigated by differential pulse voltammetry (DPV). Experiment with non-complementary oligonucleotides was carried out to assess the selectivity of the developed electrochemical DNA biosensor. The target HBV DNA could be quantified ranged from 1.01×10^{-8} to $1.62 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ with good linearity ($\gamma = 0.9962$). The detection limit was $7.19 \times 10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (3σ , $n = 11$).

2. A novel method for sensitive detection of single stranded DNA (ssDNA) using 2-mercaptobenzothiazole (MBT) self-assembled monolayer modified gold electrode has been developed. Based on the intercalating effect of MBT into double stranded DNA (dsDNA), Au-MBT electrode possessed the ability to distinguish ssDNA and

dsDNA. Cyclic voltammetry (CV) and scan electron microscope (SEM) were used to preliminarily characterize the MBT self-assembled monolayer on gold electrode. In the mixture of excessive probe ssDNA and target ssDNA, current signal recorded by differential pulse voltammetry (DPV) after DNA hybridization reflected the extent of the hybridization. Definite relations were observed between the reductive peak currents and the concentration of target ssDNA. The quantitative detection of target ssDNA was achieved with a linear range from 1.59×10^{-8} to $2.4 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. The detection limit was $2.38 \times 10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (3σ , $n = 11$). The Au-MBT electrode possessed high reusability and reproducibility, no significant deterioration of peak currents occurring over 10 detection/regeneration cycles. Combined with the advantages of simplicity and low-cost, the developed electrochemical biosensors show potential in continuous and quantitative detection of ssDNA in biological samples.

3. A method for sensitive detection of ssDNA using 2-mercaptobenzimidazole (MBI) self-assembled monolayer modified gold electrode has been developed. Firstly, a glassy carbon electrode which had been modified with probe ssDNA was used to separate the target ssDNA from sample and then target ssDNA was transfer to a new solution, Au-MBI electrode detect target ssDNA in the solution. The quantitative detection of target ssDNA was achieved with a linear range from 1.32×10^{-8} ~ $1.59 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, the detection limit was $4.58 \times 10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. (3σ , $n = 11$).

KEY WORDS: electrochemical DNA biosensor, Voltammetry, $[\text{CdL}_2]^{2+}$, 2-mercaptobenzothiazole, 2-mercaptobenzimidazole

独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除了文中特别加以标注和致谢中所罗列的内容以外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得其他教育机构的学位或证书使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

申请学位论文与资料若有不实之处，本人承担一切相关责任。

本人签名：谭倩倩

签字日期 2008 年 6 月 6 日

关于论文使用授权的说明

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权学校可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。本人离校后发表或使用学位论文或与该论文直接相关的学术论文或成果时，署名单位仍然为青岛科技大学。
(保密的学位论文在解密后适用本授权书)

本学位论文属于：

保密 ，在 年解密后适用于本声明。

不保密 。

本人签名：谭倩倩

签字日期：2008 年 6 月 6 日

导师签字：张书圣

签字日期：2008 年 6 月 6 日

第一章 前言

核酸是生物体内一类含有磷酸基团的重要的生物大分子,担负着生命信息的储存和传递,是生命化学研究中一个重要领域。脱氧核糖核酸 (Deoxyribonucleic Acid, DNA) 是核酸的一种,它是主要的遗传物质,是遗传信息的载体,具有贮存和传递信息的功能,对它的研究在生命科学中具有重要的意义。研究 DNA 的结构和功能,可以从分子水平上了解生命现象的本质,解释药物的作用机理。人类的许多遗传疾病与其 DNA 序列不同程度的变异有关。基因突变、癌变以及老化过程都可能涉及到 DNA 的碱基损伤,因此对 DNA 的研究是现代生物学、医学和生命科学的重要课题之一。

对 DNA 常见的分析方法有电化学法、荧光光度法、光散射技术及色谱法等,其中 DNA 电化学传感器是目前 DNA 传感器中最成熟的一种,文献报道最多^[1-6]。电化学 DNA 传感器是近几年迅速发展起来的一种全新思想的生物传感器,其用途是检测基因及一些能与 DNA 发生特殊相互作用的物质。由于它具有选择性好,灵敏度高,测试费用低及抗干扰等优点,已被广泛应用于研究 DNA 的结构形态^[7]、碱基序列^[8]、DNA 的损伤^[9,10]、基因诊断^[11,12]、病毒检测^[13]及蛋白质链的分析^[14]等诸多领域。

1.1 DNA 的组成、结构及其变性与复性

1.1.1 DNA 的组成

DNA 是核酸的一种,是大量脱氧核苷酸的聚合体。脱氧核糖核苷酸由碱基、脱氧核糖和磷酸构成。DNA 的碱基有四种,即腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、胞嘧啶(C)和胸腺嘧啶(T)。DNA 在碱基组成上遵从 Chargaff 规则,A 与 T 的量相等,G 与 C 的量相等,即碱基互补,并且嘌呤的总数等于嘧啶的总数。

1.1.2 DNA 的结构

DNA 是以 4 种脱氧核苷酸为基本单元组成的多聚核苷酸,脱氧核苷酸之间通过磷酸二酯键相连接。脱氧核苷酸由脱氧核糖、磷酸根和碱基 3 种成分组成。脱氧核糖是在 2' 位没有羟基的五碳糖。碱基连接于脱氧核糖的 1' 位,磷酸基团连接于脱氧核糖的 3' 位羟基或 5' 位羟基。构成 DNA 分子的基本单元的脱氧核苷酸通过 3',5'-磷酸二酯键相连形成 DNA 分子。

DNA 的结构分为一级结构和空间结构。DNA 由多条脱氧核糖核苷酸链构成，每条链均以磷酸基（磷酸酯键）为桥从一个核苷的 3' 连接到相邻核糖的 5' 位置上，这就是 DNA 的一级结构。空间结构又分为二级结构和三级结构，其中二级结构就是由 James Watson 和 Francis Crick 在 1953 年确定的 DNA 的双螺旋结构，它是现代生物学诞生的标志。DNA 双螺旋结构十分稳定，主要有三种力量来维持结构的稳定：(1)互补碱基对之间的氢键；(2)碱基堆积力，它主要是由于芳香族碱基的 π 电子之间相互作用而引起 DNA 分子中的碱基层堆积，结果在 DNA 分子内部形成一个疏水的核心 (hydrophobic core)；(3)磷酸残基上的负电荷与介质中的阳离子之间形成的离子键。其中第二种力是主要结合力。在二级结构的基础上，DNA 还可扭曲或卷曲形成三级结构。

1.1.3 DNA 的变性与复性

1.1.3.1 DNA 变性—DNA 生物功能表现所必需的

DNA 受到某些理化因素的影响，使分子中的氢键、碱基堆积力等被破坏，双螺旋结构解体，分子由双链 (dsDNA) 变为单链 (ssDNA) 的过程称为变性。变性的实质是维持二级结构的作用力受到了破坏，即双螺旋破坏。但是 DNA 的一级结构未变，即变性不引起共价键的断裂。

引起变性的外部因素：加热、极端的 pH、有机溶剂、尿素、甲酰胺等。它们都能破坏氢键、疏水键、碱基堆积力，从而破坏双螺旋。在实际应用中，DNA 的热变性用得较多。

DNA 变性后的表现：分子由具有一定刚性变为无规则线团，DNA 溶液的粘度降低，沉降速度增加；藏在里面的碱基全部暴露出来，使 DNA 的 A_{260} 增加，即表现出增色效应 (hyperchromic effect)。

在活细胞内，DNA 在表现其生物活性时，要解开双螺旋链，实质上也是一个变性过程。因此，DNA 变性也是其生物功能表现所必需的。

1.1.3.2 DNA 复性—核酸研究中的常用手段

DNA 的变性是可逆的，解除变性条件，满足一定条件后，解开的两条 DNA 互补链又可以重新恢复形成双螺旋结构，并恢复有关的性质和生物功能。这个过程称为 DNA 复性。例如，对热变性的 DNA 溶液，缓慢冷却，双螺旋又重新形成，之所以变性 DNA 能够复性，是由于互补链的存在，且满足了复性条件，如复性温度、DNA 浓度、溶液离子强度等。在核酸杂交的研究中要经常利用 DNA 的变性和复性。有时候变性以后如果不想让它复性就要改变复性条件。例如，热变性的 DNA 溶液迅速冷却，复性条件无法达到，dsDNA 变为 ssDNA 以后无法再变回

dsDNA。

1.2 小分子化合物与 DNA 的作用方式

DNA 分子中平行堆积的碱基、聚合的阴离子磷酸骨架和两条核苷酸链螺旋形成的大沟和小沟构成了有机小分子与 DNA 相互结合的位点，作用的方式主要有非共价结合、共价结合、剪切作用三种类型。

1.2.1 非共价结合

非共价结合包括静电结合、沟内结合和嵌插结合。另外还有氢键、离子键、范德华力、疏水键这些弱的相互作用。小分子通过沟内或嵌插结合在核酸的螺旋沟或碱基中，加上静电力的作用，常会诱发许多生物效应，阻碍核酸信息的正常表达。同时，这三种力还凭借氢键、范德华力、疏水作用等使相互作用加强。

(1)静电结合 (electrostatic binding)，即小分子与 DNA 分子的带负电荷的核糖磷酸基骨架之间通过静电作用而结合。该作用没有选择性，是非特异性的。通常认为单纯的静电结合模式在作为药物的应用上价值不大，但有些分子与 DNA 的静电作用对其与 DNA 间的嵌插作用起着重要的稳定作用。

(2)沟内结合 (groove binding)，即小分子与双链 DNA 的大沟或小沟的碱基边缘直接发生相互作用。大沟区、小沟区在电势能、氢键特征、立体效应、水合作用上都有很大不同。小分子与 DNA 的小沟壁紧密作用，这是由于小沟区为 A-T 富集区，而且存在水合结构，具有芳香环结构的小分子易于自由扭转来适合小沟区，同时取代沟内的水分子进入小沟区，作用形式主要是氢键作用和范德华力。大分子蛋白质与 DNA 在大沟结合。

(3)嵌插结合 (intercalation binding)，即平面或几乎平面的芳香环嵌入 DNA 分子双螺旋的碱基对之间。结合的作用力来自芳环的离域 π 体系与碱基的 π 体系间形成的 π - π 相互作用及疏水相互作用。这种作用是药物分子与 DNA 发生作用的重要形式之一。

1.2.2 共价结合

与非共价结合相比，小分子化合物与 DNA 共价结合的序列特异性识别能力要强许多。小分子与 DNA 特定碱基作用形成加合物，使 DNA 的双链解旋且发生弯曲。如苯并二吡咯类抗生素 (duocarmycin) 及其衍生物只能在 DNA 小沟中对 AT 富集区识别，分子中活泼的环丙烷与小沟区内特定碱基序列中 A 的 N3 共价结合后导致在该位点脱去嘌呤^[15]。

1.2.3 剪切作用

具有剪切作用的分子特异选择结合位点,并最终使 DNA 链断裂。博莱霉素^[16] (Bleomycin) 是一种典型的 DNA 切割化合物,分子结构的特殊性使其能够识别并结合在 DNA 中 5'-GC-3'序列的鸟嘌呤上,然后经一系列化学反应最终导致 DNA 断链,这种双功能性对于设计人工核酸酶及发展有效的抗肿瘤药物具有非常重要的指导意义。

1.3 DNA 与小分子作用的研究方法

在研究小分子和 DNA 相互作用的过程中,表征手段和研究方法是获得可靠信息的关键。常用的分析方法主要有电化学法、光谱法、序列凝胶电泳及足印迹分析技术、X-射线晶体衍射分析法及粘度法等。

1.3.1 电化学法

自 Bard 等人最先用电化学方法对溶液中的电活性金属配合物与 DNA 相互作用进行研究后^[17],电化学研究方法迅猛发展。一方面,因为电化学方法具有快速、灵敏、样品消耗量少和仪器简单的优点,其在 DNA 结构分析、药理分析及 DNA 传感方面的应用越来越受重视,而且显示出了惊人的发展速度。另一方面,由于生物体系是一个充满电解质溶液的体系,绝大多数反应都发生在膜系统的界面上,因而尽管存在许多物理和化学上的差异,电化学体系仍然是一个非常好的生物体系模拟,是了解 DNA 的理化性质的有效手段之一。

对 DNA 的电化学行为的研究是实现 DNA 电化学检测、DNA 传感器设计及研究 DNA 与靶向分子作用的基础。常用的电化学技术包括:①循环伏安法和线性扫描伏安法^[18,19];②方波伏安法^[20];③微分脉冲伏安法^[21];④电位溶出伏安法^[22];⑤交流阻抗^[23]等。

Bard^[24-26]等人系统研究了 $\text{Os}(\text{bpy})_3^{2+}$ 、 $\text{Co}(\text{bpy})_3^{3+}$ 、 $\text{Fe}(\text{bpy})_3^{3+}$ 、 $\text{Co}(\text{phen})_3^{3+}$ 、 $\text{Fe}(\text{phen})_3^{3+}$ 等金属配合物和 DNA 的相互作用后发现,若 E_0 向负方向移动,则小分子与 DNA 发生静电作用;若 E_0 向正方向移动,则小分子与 DNA 发生嵌插作用,这也成为电化学法研究小分子和 DNA 相互作用时的重要依据。

Zhou等^[27]采用电化学方法包括循环伏安法、微分脉冲伏安法等研究了 $\text{Co}(\text{phen})_3^{+3}$ (phen = 1,10-邻菲咯啉、联吡啶)与6-巯基嘌呤配合物及DNA 间的作用机理。结果表明 $\text{Co}(\text{phen})_3^{+3}$ -6-巯基嘌呤与DNA 是部分的嵌插作用相结合,而 $\text{Co}(\text{bpy})_3^{+3}$ 则是通过静电作用相结合。这项研究将有助于应用6-巯基嘌呤来设计和合成镇咳药物。

彭图治^[28-30]等人采用循环伏安法和计时库仑法等电化学手段研究了更生霉素、Hoest 33258、米托蒽醌等小分子和 DNA 的相互作用并推导出不可逆电活性分子与 DNA 相互作用的电化学公式, 可以便捷准确的计算 DNA 与配体结合常数和结合位点信息。

1.3.2 光谱法

几乎所有的光谱学技术都可以用来研究小分子与 DNA 的相互作用, 其中紫外-可见光谱、分子荧光光谱、圆二色谱、线二色谱是较为常用的方法。

(1) 紫外-可见光谱法: 紫外-可见光谱法是研究小分子与 DNA 相互作用机理最常用、最方便的方法。DNA 分子中的碱基具有光学活性, 在 260 nm 附近有特征吸收, 但与小分子作用后由于其吸收光谱变化通常较小, 因此一般不选该吸收峰作为研究对象。许多小分子本身有光学活性, 与 DNA 作用后会发生某些变化, 因此常用紫外-可见光谱来研究小分子与 DNA 的作用。

(2) 荧光光谱法: 有些小分子与 DNA 结合后, 会使原本荧光很弱的分子荧光强度增大很多。有些小分子与 DNA 结合后, 会发生荧光猝灭作用。利用这些现象, 可用荧光光谱法进行分析, 获得热力学和动力学数据。

(3) 圆二色光谱法和线二色光谱法: 圆二色光谱(CD)是以高频变换的左旋或右旋偏振光作为入射光, 一方面根据 DNA 在 240~290 nm 处的吸收能提供有关其二级结构的信息, 确定 DNA 的构象; 另一方面对一些本身没有 CD 信号, 但在与 DNA 结合后能产生诱导 CD 的分子可获取有关其结构的一些间接信息。线二色光谱(LD)则采用了与固定光轴方向平行或垂直的平面偏振光。

1.3.3 序列凝胶电泳及足印迹分析技术

序列凝胶电泳及足印迹分析技术是生物学中用来研究小分子与 DNA 相互作用最基本的两种手段^[31]。凝胶电泳可以考察 DNA 剪切或其它分子与 DNA 螺旋共价结合留下的永久性痕迹, 研究其它分子与 DNA 作用的序列特异性; 对于多数与 DNA 发生非共价结合的分子来说, 足印迹法及转录足印迹法是确定其结合位点的比较好的方法, 其中转录阻断的方法更易判断序列特异性较高的药物结合位点。

1.3.4 X-射线晶体衍射分析法

对于 DNA 与小分子结合后所引起的结构变化, 用 X-射线晶体衍射分析(XRD)可提供直接的结合位点及结构变化的信息^[32], 但需要提供小分子与 DNA 加和物的晶体。由于目前在培养小分子与 DNA 加和物的晶体方面存在一定的困

难,这方面的研究现在开展不多。另外,还存在晶体状态下的分子构型与其生理环境下的液相构型是否一致的问题。

1.3.5 粘度法

在没有晶体结构数据的情况下,粘度测定是检测小分子与 DNA 是否以插入方式结合的最有效的方法。小分子配合物以其插入配体通过经典的插入方式与 DNA 作用时, DNA 相邻碱基对的距离会变大以容纳插入配体,因而导致 DNA 双螺旋伸长, DNA 溶液的粘度增加;当以静电、沟面结合等非插入方式与 DNA 作用时, DNA 溶液的粘度无明显变化;以部分插入方式与 DNA 作用时,则可能使 DNA 双螺旋发生扭结,使其粘度减小^[33,34]。

1.3.6 其它方法

此外,原子力显微镜(AFM)和扫描隧道显微镜(STM)可以直观的观察小分子与 DNA 结合的方式,是人们研究小分子和 DNA 相互作用的重要方法^[35]。微量热法、能量转移法等也是近几年来发展起来的无损分析法。

总之,对于小分子化合物与 DNA 相互作用的研究,仅用单一的方法是远远不能令人满意的,而应采取多种分析方法进行全方位、多层次的研究,以获得作用结合方式、结合位点数、反应热力学、动力学数据等较为完备和可靠的结论。

1.4 DNA 电化学生物传感器的研究

1.4.1 DNA 电化学生物传感器的基本结构

DNA 电化学生物传感器是90年代的一个新的研究热点。它是将有反应活性的一单股寡核苷酸固定在某种支持物(感受器)上作为探针,它可以在含有复杂成分的环境下特异地识别出某一靶子底物,并通过换能装置把非电量生物信号转换为电信号。DNA 电化学传感器是一种全新的基因检测技术,它不仅具有分子识别及传感功能,而且还具有良好的分离纯化基因功能,因此在分子生物学和生物医学工程领域有很大的实际意义。

DNA 电化学生物传感器主要由两个部分组成,一是由 DNA 探针构成的感应器,二是换能器。DNA 探针一般是人工合成的单链 DNA(ssDNA)片段,其碱基序列与靶基因的碱基序列互补。换能器的功能是将 DNA 杂交信息转换为可测定的电信号,根据信号差异可以定性定量检测靶基因。

DNA 电化学传感器因其具有受环境干扰小,电信号测量比较简单,不需要激光诱导或精密的分光器件等装置和仪器成本低等优点,是最有发展前景的一类

DNA 分析方法。

1.4.2 DNA 电化学生物传感器的原理

DNA 电化学传感器根据信号转换方式的不同可以分为两类：一类是有标记的方法 (labelled methods)，另一类是无标记的方法 (label-free methods)。有标记的方法是通过可以和 DNA 通过嵌插作用结合的氧化还原活性小分子的电信号的变化来区分 ssDNA 和 dsDNA。它是以电极为换能器，将一定长度(通常为十五到五十个碱基)的单链 DNA(ssDNA)片段固定到电极(如金电极、玻碳电极等)表面，形成 DNA 探针，在一定的温度、离子强度、pH 等条件下，这种 DNA 探针上的 ssDNA 与溶液中与之互补的靶 DNA(cDNA)发生特异的选择性杂交，杂交结果形成双链 DNA(dsDNA)，这种转变的结果通过电活性杂交指示剂所引起的电压、电流或电导等电信号的变化体现出来，从而可对特定序列的靶基因进行定性定量检测。无标记的方法的表现方式有两种：一种是通过 DNA 本身鸟嘌呤的电化学信号；另一种是比较 ssDNA 和 dsDNA 在电极表面的电化学特征的不同，可以通过电化学阻抗的方法来表征。

应用 DNA 电化学传感器进行分析时主要步骤如下：

(1) DNA 探针的固定，即要将 ssDNA 连接或者固定到一个固体电极的表面，形成 DNA 探针电极。

(2) 分子杂交过程，DNA 探针电极放入被测溶液，与互补的目标 ssDNA 在最佳条件下杂交形成 dsDNA，这一过程中必须控制合适的杂交条件。

(3) 杂交的指示，即将杂交信息转化为可测定的电化学信号，通过电流、电压、电导、电容或电化学阻抗的变化作为检测信号。

(4) 杂交信号的电化学测量，根据所选择电化学指示剂的不同，用相应的电化学方法完成电化学信号的测定。

其中，DNA 探针的筛选、固定以及杂交的指示是这类传感器的关键技术，研究小分子和 DNA 的相互作用对于筛选合适的杂交指示剂具有重要的意义。

1.4.3 ssDNA 的固定方法

固定 ssDNA 的基底有很多种，常用的基底有电极以及便于分离的磁性纳米颗粒^[36,37]，其中电极有碳质电极和金属电极。碳质电极包括玻碳电极^[38,39]、碳糊电极^[40,41]、热解石墨电极^[42]等，金属电极包括金电极^[43]、铂电极等。磁性纳米颗粒结合了磁性粒子和纳米材料的优点，是一种新型的亲和性固相载体，具有粒径小，超顺磁性和比表面积大等特性，作为基因载体有着优越的特性，可能成为最有前景的基因载体材料。

固定 ssDNA 的方法也因电极种类的不同而不同,常用的固定方法主要有吸附法、共价键合法、自组装法、组合法等。

1.4.3.1 吸附法

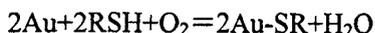
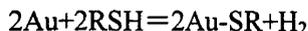
即将 DNA 直接滴涂或在一定电位富集吸附到电极表面。早期的电化学传感器一般都用此种方法。Wang^[44]等在 0.1 mol·L⁻¹ pH 5.0 的乙酸缓冲溶液中于 +1.7 V 处理碳糊电极 1 min, 然后于 +0.5 V 吸附 DNA 探针 2 min, 从而固定 DNA 探针。也有文章用两步吸附法固定 DNA, 庞代文等^[45]采用先通过 2,2'-二硫乙醇自组装得到自组装单分子层(SAM), 再在 SAM 上共价键合和吸附固定 DNA 制备了两类 DNA 修饰电极, 并对得到的 DNA 修饰电极进行了电化学和谱学表征。周家宏等^[46]先在裸金电极上吸附聚赖氨酸, 然后再将电极浸入 DNA 水溶液中制得 DNA 修饰电极。吸附法相对简单, 但是结合的力度和方向性较差, DNA 在溶液中有可能脱附或结构扭曲而不易发生正确的杂交反应。

1.4.3.2 共价键合法

这是 DNA 分子固定的一种常用方法。它是将电极表面预处理后产生各种功能的活性键合基因, 再与 ssDNA 发生有机反应, 通过共价键的形成把 ssDNA 固定在电极表面。方禹之^[47-49]等人用多种方法将 ssDNA 片段固定在石墨电极上, 如用 EDC 或 NHS 活化已被氧化的光谱纯石墨电极, 用于固定 ssDNA; 或用 5% 3-氨基丙基三乙氧基硅烷 (PrNH₂, 硅烷 II) 将石墨电极表面硅烷化以引入氨基, 再用 EDC 为偶联活化剂, 将 ssDNA 固定于电极表面。

1.4.3.3 自组装法

根据分子的自组装作用, 在电极表面形成高度有序的 ssDNA 单分子层, 通常是利用巯基化合物修饰 ssDNA 后再组装于金电极的表面形成单分子层, 有研究结果已证实硫醇化合物与金电极的作用机理如下:



Au-S 间的结合很强 (键能 84 kJ/mol), 很少有其它基团与之竞争, 保证了这种吸附的选择性。同时巯基和大多数有机基团的反应性强, 使得巯基衍生物制备不太困难, 为自组装单分子膜 (SAM) 外表面基团的控制提供了方便^[50]。自组装单分子膜分子排列和 LB (Langmuir-Blodgett) 膜一样有序紧密, 而且不易被水和有机溶剂溶解洗脱。SAM 对酸、碱和离子渗透都有较强的抵抗能力, 在超低温、超高真空 (UHV) 条件下也保持相对稳定。SAM 技术结合了化学吸附的稳定性和

LB 膜的有序性, 通过变化头基、尾基以及链的类型和长度可以控制和改变单层的结构和性质, 通过选择适当的尾基可以赋予 SAM 外表面以特定的性质, 并可为进一步组装提供活性结合点。

金电极上的巯基自组装研究主要集中在固定方法及条件方面。DNA 在金电极的自组装固定方法主要有两种: (1) 有机硫化物或二硫化物在金电极上形成自组装膜, 引入各种所需的活性基团, 如羧基、羟基、氨基等, 然后用偶联活化剂 DNA 通过共价反应连接在自组装膜上, 或是利用自组装膜上基团与 DNA 嵌插作用固定。(2) 先将 DNA 进行衍生化反应, 在 DNA 上连接上 -SH 基或 S 原子, 后将衍生化的 DNA 直接自组装固定在金电极上, 得到结合牢固、排列有序、分布均匀的单层 DNA 自组装膜。

鞠焯先等^[51]使用碳二酰亚胺 (EDC) 活化巯基乙酸自组膜, 然后将 ssDNA 固定在自组膜上, 并用 X-射线光电子能谱 (XPS) 表征 DNA 修饰电极, 金电极表面 X-射线光电子能谱谱图出现 P、N、S 等元素的特征吸收峰, 说明 DNA 被成功固定在金电极上。

Kerman 等^[52]使用 EDC 和 NHS 为键合试剂将寡聚核苷酸探针固定在 3-巯基丙酸(MPA)自组装膜上, 并对其固定机理进行探讨, 认为 ssDNA 上的氨基与 NHS 活化的巯基丙酸自组装膜形成肽键, 从而将 ssDNA 固定, 并可以进一步发生杂交反应。

Nakamura 等^[53]使用含有蒽基的不对称二硫化物 (Anth-S-S-C₈) 制备含有蒽基的自组装膜, 利用蒽基与 DNA 的嵌插作用固定探针 DNA, 当蒽基在金电极表面的覆盖度为 30%时, 使用原子力显微镜 (AFM) 和石英晶体微天平 (QCM) 观测到该法固定的 ssDNA 可有效杂交, 该方法的优点是固定过程中 DNA 未发生任何化学反应, 缺点是探针 DNA 易被靶 DNA 取代。

另一种自组装法是将 DNA 探针衍生化修饰上巯基, 然后将巯基修饰 ssDNA 直接与金电极进行自组装。这种方法制备的 DNA 探针表面结构高度有序、稳定性好、易于发生杂交反应, 但对巯基修饰过程要求较高^[54]。

1.4.3.4 组合法

将化学修饰剂与电极材料如石墨粉混合后制备组合修饰电极, 再利用 ssDNA 与修饰剂的相互作用而固定 DNA 探针。Millan 等^[55]将 18-烷基胺、18-烷基酸混入碳糊中得到化学修饰的碳糊电极, 该电极表面富含有氨基或羧基, 然后在 EDC 存在下, 通过 18-烷基胺的氨基与 ssDNA 的 5'末端的磷酸基形成磷酸胺键, 把 ssDNA 固定到电极上;或在 EDC 和 NHS 存在下, 通过 18-烷基酸的羧基与 ssDNA 的磷酸基形成磷酸酯键, 将 ssDNA 固定到电极上。这种方法制备的电极修饰层

相对稳定，易于杂交反应的发生，但其再生能力较差，使用次数有限。

1.4.4 杂交指示剂的分类

杂交指示剂是一类能与 ssDNA 和 dsDNA 以不同方式相互作用的电活性化合物，且其氧化还原电位处于 DNA 的电化学窗口范围内 (+1.2V~-0.9 V, vs. SCE)。当它与 DNA 结合后，发生可逆的氧化还原反应时，可与 DNA 发生电子交换，DNA 通过远程电子传递而使指示剂与电极发生电子交换完成电化学反应过程，因此杂交指示剂的选用对传感器灵敏度的影响甚大。另外，研究小分子与核酸的相互作用不仅对阐明抗肿瘤、抗病毒及致癌物的作用机理，而且对进一步指导人工核酸酶的合成及核酸高级结构的研究等方面具有重要意义。

电化学杂交检测主要基于指示剂对 dsDNA 和 ssDNA 的电化学行为的不同。杂交指示剂其中一类是可以嵌插入 dsDNA 碱基对之间而不能和 ssDNA 发生嵌插作用的氧化还原小分子，另一类是或者和 ssDNA 优先结合或者和 dsDNA 优先结合的电化学活性小分子。这种杂交指示剂可以分为有机染料、抗癌药物、金属配合物三类。近十几年来，据报道发现了一系列酶^[56,57]，金属纳米粒子^[58-62]或脂质体标记^[63,64]的杂交指示剂。

1.4.4.1 有机染料类

染料分子作为一类重要的 DNA 靶向分子，其研究一直受到人们的重视，这对于了解 DNA 分子的理化性质和筛选合适的 DNA 杂交指示剂具有重要价值。由于染料分子中一般存在不饱和基团或大的共轭 π 键体系，有的还具有荧光性能，所以光度法、荧光法、电化学法和共振光散射法等方法已经应用于研究染料分子和 DNA 的相互作用。常用的染料类指示剂有双苯并咪唑类(如 Hoechst 33258)、亚甲基蓝、红四氮唑、乙锭类、中性红等。双苯并咪唑染料是其中较为理想的一类，有较其它指示剂高得多的电流密度，大约为 $45 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ^[65]。

Erdem^[66]等分别用 dsDNA 和 ssDNA 修饰的碳糊电极(CPE)和裸 CPE，对亚甲基蓝(Methylene Blue, MB)进行了循环伏安(CV)研究，认为 MB 是较有潜力的一种新型电活性杂交指示剂。

姜慧君^[67]等人采用光谱电化学法研究了中性红(NR)和 DNA 的相互作用并发现随着溶液 pH 值的改变，由于 NR 分子存在方式不同，NR 与 CT-DNA 之间相互作用的方式也随之不同。在 pH=7.0 时，二者的作用方式主要为嵌插作用，当 pH=6.0 时，二者主要的作用方式改变为静电作用。

1.4.4.2 药物小分子类

常用药物小分子有蒽环类、烯炔类、多肽及蛋白质类、乙撑亚胺类等, 研究药物分子和 DNA 的相互作用, 可以了解药物的药理和毒性, 特别是对于了解药物分子对 DNA 特定位点的识别作用以及对 DNA 构象产生的影响, 在体外筛选出高效合理的抗癌药物具有重要意义。应用药物小分子作为杂交指示剂发展起来的电化学传感器方法简单, 选择性高。

Wong 和 Gooding^[68]用带负电的磺酸蒽醌类抗癌药物的衍生物作为指示剂提高了 DNA 长程电子转移的活性。他们应用 Tarlov^[69]等人的方法处理金电极表面, 将巯基修饰的 DNA 自组装到金电极表面, 然后将电极浸入巯基乙醇中以提高探针 DNA 的表面固定量。将固定好探针的电极浸入含有目标 DNA 和蒽醌类指示剂的溶液中杂交一个小时, 指示剂嵌插入 dsDNA 的碱基对之间并且通过 DNA 的长程电子转移作用被检测到。此种方法可以同时杂交目标 DNA 和嵌插指示剂, 并且可以区分互补和只有一个碱基错配的目标 DNA, 检测限可达到 0.5 nm。而且, 此种传感器可以实时检测 DNA 的杂交情况^[70]。

1.4.4.3 金属配合物

一些金属配合物特别是过渡金属配合物因其中心离子的变价性而可被用作杂交指示剂, 并广泛用于 DNA 电化学传感器的分析应用中。较常用的此类金属离子有 Co、Os、Fe、Ru、Cu 等的离子形式^[71], 常用的配体有 2,2'-联吡啶、1,10-邻菲咯啉、4,4'-二甲基-2,2'-联吡啶、二氮杂芴酮缩聚苯二胺等。其主要作用有两种: ①设计人工核酸酶从而实现 DNA 链上某些特定位点的剪切作用; ②设计性能优良的抗肿瘤药物或抗病毒药剂。

Mikkelsen^[72,73]等人选择 Co^{3+} 作为中心离子, 合成了 $\text{Co}(\text{phen})_3^{3+}$ 、 $\text{Co}(\text{bpy})_3^{3+}$ 配合物, 发现此种类型的配合物和 DNA 的小沟区有很强的结合力, 并且和 dsDNA 的结合力比与 ssDNA 的结合力大很多, 由此可以选择性的区分 dsDNA 和 ssDNA, 现在此领域正在致力于合成一些能与 DNA 的小沟区有很强的结合力的过渡金属离子配合物, 用这种配合物作指示剂检测限可达到 27pm。

1.4.4.4 标记型杂交指示剂

此类型即是具有电化学活性或具有特殊生物功能材料的小分子直接标记在 ssDNA 片段上形成 DNA 探针, 将待测 DNA 固定在电极上, 在一定的温度、pH 值和离子强度条件下与标记 DNA 探针进行杂交反应, 从而对靶序列 DNA 片段进行识别和测定。常用的标记物有: 具有电化学活性的分子^[74,75]、酶^[76,77]以及纳米材料^[78,79]。

将电活性物质(如二茂铁、蒽醌、聚吡咯、聚噻吩等)标记在 DNA 探针上。当

探针与靶基因发生杂交时, 电流强度会发生改变。Bauerle 等研究了碱基与聚噻吩的结合, 首先观察单个碱基的作用, 之后试验了 15 个碱基 DNA 与聚噻吩的作用情况, 认为其作为杂交指示剂前景是乐观的。

磁珠很容易去除电极表面非特异性键合 DNA^[80]。一种酶联夹心式杂化分析在一个固定到碳粒标记的碳针上完成, 靶 DNA 能捕获链酶亲和素-碱基磷酸酶。易操作的屏迹电极上低电位的 (+0.1 V vs Ag/AgCl) 微分脉冲伏安峰可以对酶促反应的 1-萘酚产物进行定量分析。

Mirkin^[81]等人利用巯基修饰的寡核苷酸在纳米金上进行自组装形成纳米金标记物, 当与其配对的靶基因序列发生杂交配对后, 就会形成网状的纳米金聚集物, 从而导致溶液颜色的变化, 使得 DNA 杂交的结果可以通过简单的颜色变化来识别, 而且灵敏度很高, 检测限可达 10 fmol 级。

Wang^[82]报道目标核酸与磁珠连接的核酸探针杂交再将镀链酶亲合素的金属纳米粒子键合到捕获 DNA 上, 然后标记金溶解后, 在单使用厚膜碳电极上用电位溶出方法测量溶解的金。

Ye^[83]报道了一种多壁碳纳米管 (MWNT) 修饰的印迹碳电极 (SPCE), 通过检测 ssDNA 的碱基 G 来检测 DNA。固定在 SPCE 上的 MWNT 加速了电子传递速率, 从而提高了灵敏度。

1.5 DNA 电化学生物传感器的应用与展望

1.5.1 DNA 电化学生物传感器的应用

DNA 传感器是近几年发展起来的一类新型传感器, 起步较晚, 发展也不完善, 但随着基因结构和功能研究的不断深入, 特别是人类基因组计划的发展, 这种传感器在基因识别及分析、生物工程研究等方面日益起着重要作用。DNA 传感器不仅可以用来识别特定碱基序列的 DNA, 还可以用来检测 DNA 的损伤, 以及一些药物与 DNA 的作用机理, 进行特定药物的设计合成, 在临床诊断, 体外药物筛选等方面都有应用。基于分子识别的电化学 DNA 生物传感器的应用已涉及环境、医药、食品等诸多领域, 大致包括 DNA 损伤研究^[84]、环境污染监控^[85]、基因疾病诊断^[86]、药物机理分析^[87]等几个方面。

1.5.2 DNA 电化学生物传感器的前景展望

今后 DNA 传感器的研究将会集中在以下几个方面: (1) 电极表面结构的优化, 主要是 DNA 的固定化新方法的研究。DNA 的固定化方法对传感器的灵敏度及重复使用起决定性作用, 现有的固化方法虽然有很大的进步, 但离标准化, 商

品化的要求相差很远。从响应的快速灵敏度和电极结构简单化的观点出发, 自组装单分子技术和光刻技术在 DNA 传感器的研究中将会被广泛采用。(2) 换能器的选用方面。DNA 传感技术, 人工神经网络技术和流动注射技术相结合, 可以筛选出选择性和活性更高的敏感元件, 研制成多功能、智能化的 DNA 传感器, 可以实现多元检测。(3) 研究和应用范围将会进一步拓宽。目前 DNA 传感器的应用相对较窄, 今后研究和应用范围将会逐步扩展到临床检验、食品卫生检验、环境检测、疾病基因诊断、基因分析、基因治疗和药物筛选, 以及在核酸杂交动力学, 酶反应动力学, DNA 合成以及 DNA 突变分析等科研工作中, DNA 传感器都将有所涉及。

1.6 立题依据

研究 DNA 的结构和功能, 可以从分子水平上了解生命现象的本质, 解释药物的作用机理。电分析化学方法具有很多优点, 如准确性好, 灵敏度高, 检测方便快速, 仪器价格低廉, 且特别适用于表面过程、薄膜修饰、电子转移过程的研究。电分析化学用于分子生物学的研究已有了重要的进展, 如: 电分析化学研究 DNA 的结构形态碱基序列, DNA 的损伤基因诊断, DNA 与其他各类金属离子、金属螯合物、各种小分子物质相互作用, 是目前电分析化学研究的热点之一。DNA 的电化学研究始于上世纪 50 年代, 最初的极谱法和伏安法工作主要集中于 DNA 的基本电化学行为的研究。后来研究范围逐渐扩大到 DNA 的结构和形态分析, DNA 与其它小分子、尤其是能识别特定碱基序列的小分子或一些药物分子之间相互作用及其机理的研究, 与生物大分子之间的相互作用及其在基因调控过程中的影响, DNA 电化学生物传感器、芯片的研究等方面。DNA 电化学传感器是目前较热门的研究方向, 电化学生物传感器是电分析化学的一个重要分支, 近年来, DNA 电化学生物传感器的研制、开发成为分子生物学和电化学中最为活跃的研究领域, 它为生命科学研究提供了一种新技术、新方法, 对临床医学和遗传工程研究具有深远的意义, 它特别适宜于具有特定序列 DNA 的研究, 它具有的顺序选择性能快速检测 DNA 序列, 且成本低, 易于集成化和自动化。在基因检测、抗癌药物筛选、药物作用机理研究等方面占有一席之地, 成为生物电化学中一个极具生命力的科学前沿。

参考文献

- [1] Bagni G., Osella D., Sturchio E., et al., Deoxyribonucleic acid (DNA) biosensors for environmental risk assessment and drug studies[J], *Anal. Chim. Acta*, 2006, 573-574: 81-89
- [2] Dhar S., Nethaji M., Chakravarty A. R., *Synthesis, crystal structure and photo-induced DNA cleavage activity of ternary copper(II) complexes of NSO-donor Schiff bases and NN-donor heterocyclic ligands*[J], *Inorg Chim Acta*, 2005, 358: 2437-2444
- [3] 高梅, 纳米粒子标记 DNA 探针在电化学 DNA 生物传感器中的应用[J], *生物磁学*, 2006, 6(1): 16-19
- [4] Wong E. L. S., Gooding J. J., Charge Transfer through DNA: A Selective Electrochemical DNA Biosensor [J], *Anal. Chem.*, 2006, 78(7): 2138-2144
- [5] Spadavecchia J., Prete P., Au Nanoparticles Prepared by Physical Method on Si and Sapphire Substrates for Biosensor Applications[J], *Phys. Chem. B*, 2005, 109(37): 17347-17349
- [6] Wang J, Electrochemical biosensors: Towards point-of-care cancer diagnostics[J], *Biosensors & Bioelectronics*, 2006, 21: 1887-1892
- [7] Mohan P. J., Datta A., Mallajosyula S. S., et al., Structures of Nucleobases Trapped within Au Triangles and Its Effects on Hydrogen Bonding in Base Pairs of DNA[J], *Phys. Chem. B*. 2006, 110(37): 18661-18664
- [8] Lubin A. A., Lai R. Y., Baker B. R., et al., Sequence-Specific, Electronic Detection of Oligonucleotides in Blood, Soil, and Foodstuffs with the Reagentless, Reusable E-DNA Sensor[J], *Anal. Chem.*, 2006, 78(16): 5671-5677
- [9] Jan V., Tomáš M., Kateřina C., et al., Electrochemical Sensing of Chromium-Induced DNA Damage: DNA Strand Breakage by Intermediates of Chromium(VI) Electrochemical Reduction[J], *Electroanalysis*, 2007, 19: 2093-2102
- [10] Stivers J. T., Kuchta R. D., Introduction: DNA Damage and Repair[J], *Chem. Rev.*, 2006, 106 (2): 213-214
- [11] Pinar K., Seda C., Afig B., et al., Electrochemical Genoassay Design for Allele-Specific Detection of Toll-Like Receptor-2 Gene Polymorphism[J], *Electroanalysis*, 2007, 19(18): 1875-1882
- [12] Armistead P. M., Thorp H. H., Electrochemical Detection of Gene Expression in Tumor Samples: Overexpression of Rak Nuclear Tyrosine Kinase[J], *Bioconjugate Chem.*, 2002, 13(2): 172-176
- [13] Ionescu R. E., Cosnier S., Herrmann, S., et al., Amperometric Immunosensor for the Detection

- of Anti-West Nile Virus IgG[J], *Anal. Chem.*, 2007, 79(22): 8662-8668
- [14] Pan Q., Zhang R., Bai Y., et al., An electrochemical approach for detection of specific DNA-binding protein by gold nanoparticle-catalyzed silver enhancement[J], *Analytical Biochemistry*, 2008, 375: 179-186
- [15] Eis P. S., Smith J. A., Rydzewski J. M., et al., High resolution solution structure of a DNA duplex alkylated by the antitumor agent duocarmycin[J], *J. Mol. Biol.*, 1997, 272(2): 237-252
- [16] 张蓉颖, 庞代文, 蔡汝秀, DNA 与其靶向分子相互作用研究进展[J], *高等学校化学学报*, 1999, 20(8): 1210-1217
- [17] Carter M. T., Bard A. J., Voltammetric studies of the interaction of tris(1,10-phenanthroline)cobalt(III) with DNA[J], *J. Am. Chem. Soc.*, 1987, 109(24): 7528-7531
- [18] Mann D.G.J., McKnight T.E., Melechko A.V., et al, Quantitative analysis of EDC-condensed DNA on vertically aligned carbon nanofiber gene delivery arrays[J], *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, 97(4): 680-688
- [19] Lee T. M. H., Hsing I. M., Sequence-Specific Electrochemical Detection of Asymmetric PCR Amplicons of Traditional Chinese Medicinal Plant DNA[J], *Anal. Chem.*, 2002, 74(19): 5057-5062
- [20] So M., Hvastkovs E. G., Bajrami B., et al., Electrochemical Genotoxicity Screening for Arylamines Bioactivated by *N*-Acetyltransferase[J], *Anal. Chem.*, 2008, 80(4): 1192-1200
- [21] Garcia T., Revenga-Parra M., Abruna H. D., et al., Single-Mismatch Position-Sensitive Detection of DNA Based on a Bifunctional Ruthenium Complex[J], *Anal. Chem.*, 2008, 80(1): 77-84
- [22] Numnuam A., Chumbimuni-Torres K. Y., Xiang Y., et al., Potentiometric Detection of DNA Hybridization[J], *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130(2): 410-411
- [23] Li B., Wang Y., Wei H., et al., Amplified electrochemical aptasensor taking AuNPs based sandwich sensing platform as a model[J], *Biosens. Bioelectron.*, 2008, 23 (7): 965-970
- [24] Carter M. T., Bard A. J., Voltammetric Studies of the Interaction of Tris (1, 10-phenanthroline) cobalt (III) with DNA[J], *J. Am. Chem. Soc.*, 1987, 109: 7528-7530
- [25] Carter M. T., Rodriguez M., Bard A. J., Voltammetric studies of the interaction of metal chelates with DNA. 2. Tris-chelated complexes of cobalt(III) and iron(II) with 1,10-phenanthroline and 2,2'-bipyridine[J], *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, 111: 8901-8911
- [26] Marisol R., Bard A. J., Electrochemical studies of the interaction of metal chelates with DNA. 4. voltammetric and electrogenerated chemiluminescent studies of the interaction of tris (2,2'-bipyridine) osmium(II) with DNA[J], *Anal. Chem.*, 1990, 62: 2658-2662

- [27] Zhou C. F., Du X. S., Li H., Studies of interactions among cobalt(III) polypyridyl complexes , 6-mercaptapurine and DNA[J], *Bioelectrochemistry* , 2007, 70 (2): 446-451
- [28] Wang S. F., Peng T. Z., Yang C. F., Investigation of the interaction of DNA and actinomycin D by cyclic voltammetry[J], *J. Electroanal. Chem.*, 2003, 544: 87-92
- [29] Wang S. F., Peng T. Z., Yang C. F., Electrochemical studies for the interaction of DNA with an irreversible redox compound - Hoechst 33258[J], *Electroanalysis*, 2002, 14: 1648-1653
- [30] Wang S. F., Peng T. Z., Yang C. F., Electrochemical determination of interaction parameters for DNA and mitoxantrone in an irreversible redox process[J], *Biophysical Chemistry*, 2003, 104: 239-248
- [31] 吕冬梅, 闵吉梅, 张礼和, 药物-DNA 相互作用的序列特异性的研究进展[J], *国外医学药学分册*, 1998, 25 (2): 65-71
- [32] Quigley G. J., Wang A. H. J., Ughetto G., et al., Molecular structure of anticancer drug-DNA complex: daunomycin plus d(CpGpTpApCpGp)[J], *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1980, 77(12): 7204-7208
- [33] Sigma D. S., Mazumder A., Perrin D. M., chemical nuclease[J], *Chem. Rev.*, 1993, 93(6): 2295-2316
- [34] Zou X. H., Ye B. H., Li H., et al., The design of new molecular "light switches" for DNA[J], *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2001, 6(2): 143-150
- [35] Obayashi M. K., Kusakawa T., Saito M., et al., Electrochemical DNA quantification based on aggregation induced by Hoechst 33258[J], *Electrochem. Commun.*, 2004, 6: 337-343
- [36] Centi S., Tombelli S., Minunni M., et al., Aptamer-Based Detection of Plasma Proteins by an Electrochemical Assay Coupled to Magnetic Beads[J], *Anal. Chem.*, 2007, 79(4): 1466-1473
- [37] Oktem H. A., Bayramoglu G., Ozalp V. C., et al., Single-Step Purification of Recombinant *Thermus aquaticus* DNA Polymerase Using DNA-Aptamer Immobilized Novel Affinity Magnetic Beads[J], *Biotechnol. Prog.*, 2007, 23(1): 146-154
- [38] Shi L. H., Liu X. Q., Li H. J., et al., Electrochemiluminescent Detection Based on Solid-Phase Extraction at Tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II)-Modified Ceramic Carbon Electrode[J], *Anal. Chem.*, 2006, 78(20): 7330-7334
- [39] Zhang R. Y., Wang X. M., Chen C., Electrochemical Biosensing Platform Using Carbon Nanotube Activated Glassy Carbon Electrode[J], *Electroanalysis*, 2007, 19: 1623-1627
- [40] Abbaspour A., Mehrgardi M. A., Electrocatalytic Oxidation of Guanine and DNA on a Carbon Paste Electrode Modified by Cobalt Hexacyanoferrate Films[J], *Anal. Chem.*, 2004, 76(19): 5690-5696
- [41] Ren Y., Jiao K., Xu G. Y., et al., An Electrochemical DNA Sensor Based on Electrodepositing

- Aluminum Ion Films on Stearic Acid-Modified Carbon Paste Electrode and Its Application for the Detection of Specific Sequences Related to Bar Gene and CP4 Epsps Gene[J], *Electroanalysis*, 2005, 17(23): 2182-2189
- [42] Joseph W., Liu G. D., Bernard M., et al., DNA-Based Amplified Bioelectronic Detection and Coding of Proteins[J], *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, 43: 2158–2161
- [43] Okamoto A., Kamei T., Tanaka K., et al., Photostimulated Hole Transport through a DNA Duplex Immobilized on a Gold Electrode[J], *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126(45): 14732- 14733
- [44] Wang J., Chicharro M., Rivas G., DNA biosensor for the detector of hydrazines[J], *Anal.Chem.*, 1996, 68: 2251-2256
- [45] 陆琪, 庞代文, 胡深等, DNA 修饰电极的研究—Ⅶ共价键和和吸附 DNA/SAM/Au 修饰电极的制备与表征[J], *中国科学 B 辑*, 1999, 29(4): 341-347
- [46] 周家宏, 杨辉, 邢巍等, 一个制备脱氧核糖核酸修饰电极的简便方法[J], *应用化学*, 2001, 18(7): 575-577
- [47] 刘盛辉, 何品刚, 方禹之, 在石墨电极上脱氧核糖核酸与米脱蒽醌嵌入作用的电化学研究[J], *分析化学*, 1996, 24: 1301-1304
- [48] 刘盛辉, 刘长林, 方禹之, 单链脱氧核糖核酸在石墨电极表面固定化的研究[J], *分析化学*, 1999, 27(2): 131-134
- [49] 方禹之, 刘盛辉, 何品刚, 用盐酸阿霉素作为嵌入剂石墨电极伏安法识别测定 DNA 片段的研究[J], *高等学校化学学报*, 1996, 17(8): 1222-1224
- [50] 董献堆, 陆君涛, 查全性, 巯基化合物组装单分子层的研究进展[J], *电化学*, 1995, 1: 248-258
- [51] Ju H. X., Ye Y. K., Zhao J. H., et al., Hybridization biosenser using di(2,2-bipyridine)osmium(III) as electrochemical indicator for detection of polymerase chain chain reaction product of hepatitis B virus DNA[J], *Anal.Biochem.*, 2003, 313: 255-261
- [52] Kerman K., Ozkan D., Kara P., et al., Voltammetric determination of DNA hybridisation using methylene blue and self-assembled alkanethiol monolayer on gold electrode[J], *Anal. Chim. Acta*, 2002, 462: 39–47
- [53] Nakamura F., Mitsui K., Hara K., et al., Preparation of self-assembled monolayers containing anthryl group toward hybridization of nucleotide[J], *Langmuir*, 2003, 19: 5823-5829
- [54] Tonya M. H., Michael J. T., Characterization of DNA probes immobilized on gold surface[J], *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, 119: 8916-8920
- [55] Mlilan K. M., Saraullo A., Mikkelsen S. R., Voltammetric DNA biosensor for cystic fibrosis based on a modified carbon paste electrode[J], *Anal chem.*, 1994, 66: 2943-2947
- [56] Zhang Y. C., Kim H. H., Heller A., Enzyme-Amplified Amperometric Detection of 3000

- Copies of DNA in a 10 μL Droplet at 0.5 fM Concentration[J], *Anal. Chem.*, 2003, 75: 3267–3269
- [57] Zhang Y. C., Kim H. H., Mano N., et al., Simple enzyme-amplified amperometric detection of a 38-base oligonucleotide at 20 pmol L^{-1} concentration in a 30 μL droplet[J], *Anal. Bioanal. Chem.*, 2002, 374: 1050–1055
- [58] Wang J., Xu D. K., Kawde A. N., et al., Metal Nanoparticle-Based Electrochemical Stripping Potentiometric Detection of DNA Hybridization[J], *Anal. Chem.*, 2001, 73: 5576–5581
- [59] Wang J., Nanoparticle-based electrochemical DNA detection[J], *Anal. Chim. Acta*, 2003, 500: 247–257
- [60] Cai H., Wang Y. Q., He P. G., et al., Electrochemical detection of DNA hybridization based on silver-enhanced gold nanoparticle label[J], *Anal. Chim. Acta*, 2002, 469: 165–172
- [61] Wang J., Xu D. K., Erdem A., et al., Genomagnetic electrochemical assays of DNA hybridization[J], *Talanta*, 2002, 56: 931–938
- [62] Wang J., Polsky R., Xu D. K., Silver-Enhanced Colloidal Gold Electrochemical Stripping Detection of DNA Hybridization[J], *Langmuir*, 2001, 17: 5739–5741
- [63] Patolsky F., Lichtenstein A., Willner I., Electrochemical Transduction of Liposome-Amplified DNA Sensing[J], *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2000, 39:940–943
- [64] Patolsky F., Lichtenstein A., Willner I., Electronic Transduction of DNA Sensing Processes on Surfaces: Amplification of DNA Detection and Analysis of Single-Base Mismatches by Tagged Liposomes[J], *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123: 5194–5205
- [65] 王素芬, 彭图治, 李建平, 电化学方法研究 DNA 与不可逆靶向分子的相互作用[J], *化学学报*, 2002, 60(2): 310–316
- [66] Erdem A., Kerman K., Meric B., et al., Methylene blue as a novel electrochemical hybridization indicator[J], *Electroanalysis*, 2001, 13(3): 219–223
- [67] 周家宏, 姜慧君, 冯玉英等, 中性红与小牛胸腺 DNA 相互作用机理的电化学和紫外-可见光谱研究[J], *应用化学*, 2001, 18 (12): 994–997
- [68] Wong E. L. S., Gooding J. J., Electronic Detection of Target Nucleic Acids by a 2,6-Disulfonic Acid Anthraquinone Intercalator[J], *Anal. Chem.*, 2003, 75: 3845–3852
- [69] Herne T. M., Tarlov M. J., Characterization of DNA Probes Immobilized on Gold Surfaces[J], *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, 119: 8916–8920
- [70] Wong E. L. S., Gooding J. J., DNA Recognition Interfaces: The Influence of Interfacial Design on the Efficiency and Kinetics of Hybridization[J], *Langmuir*, 2005, 21: 6957–6965
- [71] Pang D.W., Abruna H.D., Interactions of benzyl viologen with surface-bound single- and double-stranded DNA[J], *Anal. Chem.*, 2002, 72: 4700–4706

- [72] Millan K. M., Saraullo A., Mikkelsen S. R., Voltammetric DNA Biosensor for Cystic Fibrosis Based on a Modified Carbon Paste Electrode[J], *Anal. Chem.*, 1994, 66: 2943–2948
- [73] Millan K. M., Mikkelsen S. R., Sequence-selective biosensor for DNA based on electroactive hybridization indicators[J], *Anal. Chem.*, 1993, 65: 2317–2323
- [74] Cosnier S., Ionescu R. E., Herrmann S., et al., Electroenzymatic Polypyrrole-intercalator Sensor for the Determination of West Nile Virus cDNA[J], *Anal. Chem.*, 2006, 78(19): 7054-7057
- [75] Matsumoto Y., Terui N., Tanaka S., Electrochemical Detection and Control of Interactions between DNA and Electroactive Intercalator Using a DNA-Alginate Complex Film Modified Electrode[J], *Environ. Sci. Technol.*, 2006, 40(13): 4240-4244
- [76] Kavanagh P., Leech D., Redox Polymer and Probe DNA Tethered to Gold Electrodes for Enzyme-Amplified Amperometric Detection of DNA Hybridization[J], *Anal. Chem.*, 2006, 78(8): 2710-2716
- [77] Fanjul-Bolado P., Hernandez-Santos D., Gonzalez-Garcia M. B., et al., Alkaline Phosphatase-Catalyzed Silver Deposition for Electrochemical Detection[J], *Anal. Chem.*, 2007, 79(14): 5272-5277
- [78] Ambrosi A., Castaneda M. T., Killard A. J., et al., Double-Codified Gold Nanolabels for Enhanced Immunoanalysis[J], *Anal. Chem.*, 2007, 79(14): 5232-5240
- [79] Das J., Aziz M. A., Yang H., A Nanocatalyst-Based Assay for Proteins: DNA-Free Ultrasensitive Electrochemical Detection Using Catalytic Reduction of *p*-Nitrophenol by Gold-Nanoparticle Labels[J], *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128(50): 16022-16023
- [80] Patolsky F., Weizmann Y., Katz E., et al., Magnetically amplified DNA assays (MADA): sensing of viral DNA and single-basemismatches by using nucleic acid modified magnetic particles[J], *Angew Chem Int Edn Engl*, 2003, 42: 2372–2376
- [81] Reynolds R. A., Mirkin C. A., Letsinger R. L., Homogeneous nanoparticle-based quantitative colorimetric detection of oligonucleotides[J], *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, 122: 3795-3796
- [82] Wang J., Xu D., Polsky R., Magnetically induced solid-state electrochemical detection of DNA hybridization[J], *J Am Chem Soc*, 2002, 124: 4208–4209
- [83] Ye Y., Ju X., Rapid detection of ssDNA and RNA using multi-walled carbon nanotubes modified screen-printed carbon electrode[J], *Biosens Bioelectron*, 2005, 21: 735–741
- [84] Palecek E., Fojta M., Tomschik M., et al., Electrochemical biosensors for DNA hybridization and DNA damage [J], *Biosen and Bioelctron*, 1998, 13: 621-628
- [85] Marrazza G., Chianella I., Mascini M., Electrochemical DNA biosensor for environmental monitoring[J], *Anal Chim Acta*, 2001, 427: 155-164

- [86] Zhou Y. J., Estavillo C., Rusling J. F., Toxicity Screening by electrochemical detection of DNA damage by metabolites generated in situ in Ultrathin DNA-enzyme films[J], J Am Chem Soc, 2003, 125: 1431-1436
- [87] Brabec V., DNA sensor for the determination of antitumor platinum compounds[J], Electrochim Acta, 2000, 45: 2929-2932

第二章 硝酸二水·双 *N*-(2-吡啶甲基)苯甲酰胺合镉(II)与 DNA 相互作用的机理及 DNA 电化学传感器的研究

2.1 引言

DNA是有机生命体中一种重要的遗传物质,是遗传信息的载体。因为它在临床诊断,司法鉴定,药物筛选方面具有重要的作用,所以现在对DNA的检测引起人们极大的兴趣^[1-6]。DNA电化学传感器具有灵敏度好,准确度高,设计简便,价格低廉等优点^[7-13],是目前DNA传感器中最热门的一种。对目标ssDNA的检测有直接和间接两种方式。所谓直接检测是利用DNA分子中的碱基自身的氧化还原信号,而间接检测是利用那些能与ssDNA和dsDNA以不同作用方式结合的电活性指示剂的氧化还原信号^[14,15]。间接检测是目前应用比较广的一种方法。自80年代以来,金属特别是过渡金属如Co(III), Fe(II), Ru(II)配合物与DNA相互作用的研究时有报道^[16-22],因为大多数金属配合物与ssDNA和dsDNA以不同作用方式结合,所以,以各种不同的金属配合物作为指示剂发展了多种DNA电化学传感器^[23-25]。

本章合成了硝酸二水·双*N*-(2-吡啶甲基)苯甲酰胺合镉(II)(简称 $[\text{CdL}_2]^{2+}$)配合物,得到了它的单晶。通过X-射线晶体衍射,确定了配合物的分子结构。在 $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7.02的NaAc-HAc缓冲溶液中,运用循环伏安法、荧光光谱法研究了 $[\text{CdL}_2]^{2+}$ 与鲑鱼精DNA的相互作用。以 $[\text{CdL}_2]^{2+}$ 为杂交指示剂,用共价键合法制备了DNA电化学生物传感器,检测乙肝病毒。希望此种方法为设计合成具有应用前景的高效低毒、抗菌、抗肿瘤药物提供一定的科学研究基础及理论依据。

2.2 实验部分

2.2.1 仪器与试剂

CHI 832B 电化学分析仪(上海辰华仪器厂); F-4500 荧光分光光度计(日本日立公司); 三电极系统: 玻碳电极为工作电极, Ag/AgCl 电极为参比电极, 铂丝作为辅助电极。

鲑鱼精dsDNA (10 mg mL^{-1} , $A_{260}/A_{280} > 1.8$, 上海华舜生物工程有限公司); $[\text{CdL}_2]^{2+}$ 按下述步骤合成; 三种21-碱基的乙肝病毒(HBV)基因片断(上海鼎安生物科技有限公司)序列如下:(探针ssDNA, S_1): 5'-GAG GAG TTG GGG GAG

CAC ATT-3'; (与探针互补序列的ssDNA, S₂): 5'-AAT GTG CTC CCC CAA CTC CTC-3'; (与探针非互补序列的ssDNA, S₃): 5'-AAA AGG TGT AAG CGT TTG CCG-3'。TE缓冲溶液: 0.01 mol·L⁻¹ Tris-HCl+1 mol·L⁻¹ EDTA, 调pH至8.0; 所有的DNA都用上述配制好的TE缓冲溶液溶解; NaAc-HAc缓冲溶液: 0.2 mol·L⁻¹, pH 7.02; 乙基-(3-二甲基丙基)碳二亚胺盐酸(EDC, 上海源聚生物科技有限公司): 5 mmol·L⁻¹; 羟基丁二酰亚胺(NHS, 中国医药(集团)上海化学试剂公司): 8 mmol·L⁻¹; 磷酸盐缓冲溶液: 50 mmol·L⁻¹, pH 7.40; 实验所用试剂均为分析纯, 水均为二次蒸馏水。

2.2.2 配合物[CdL₂]²⁺的合成^[26]

恒压滴液漏斗, 三口烧瓶, 和三通等装置在烘箱中进行干燥处理。将 2-(2-氨基甲基)吡啶 (2 mL, 19 mmol), 三乙胺 (2.63 ml, 19 mmol) 溶于 25 mL 无水二氯甲烷中。在冰浴及氩气保护条件下, 缓慢滴加溶解入二氯甲烷中的苯甲酰氯 (2 ml, 17.2 mmol)。冰浴滴加完后, 室温下搅拌反应 1 h, 然后 333 K 下反应 5 小时。过滤后, 滤液用蒸馏水洗涤, 有机层用无水硫酸钠干燥, 抽滤, 滤液浓缩至干, 得到黄色油状物质。即为配体, 产率 91.2%。

室温搅拌下, 将溶于无水乙醇(5 ml)的 Cd(NO₃)₂·4H₂O(0.12 g, 0.39 mmol)慢慢滴加到溶于乙酸乙酯(10 ml)的配体(0.16 g, 0.75 mmol)溶液中, 反应五小时后, 有白色沉淀出现, 沉淀溶于乙醇培养配合物单晶。

2.2.3 [CdL₂]²⁺与 dsDNA 相互作用的荧光光谱研究

我们用荧光光谱法对[CdL₂]²⁺与 dsDNA 的相互作用情况进行了研究, 在 0.2 mol·L⁻¹ (pH 7.02) NaAc-HAc 缓冲溶液中加入一定量的[CdL₂]²⁺测定其荧光信号, 然后再加入适量的鲑鱼精 dsDNA 室温下放置 8 min, 充分反应, 用荧光仪测定加入鲑鱼精 dsDNA 前后的荧光信号的变化。

2.2.4 [CdL₂]²⁺与 dsDNA 相互作用的电化学行为

在 2 mL 0.2 mol·L⁻¹ NaAc-HAc 缓冲溶液中, 加入适量的配合物溶液, 用上述电化学分析仪记录体系的循环伏安曲线; 然后加入不同量的鲑鱼精 dsDNA, 充分作用后测定相应的循环伏安曲线。循环伏安法的条件: 起始电位-1.1 V, 最高电位-0.6 V, 最低电位-1.1 V, 扫速为 0.1 V·s⁻¹, 取样间隔 0.001 V, 静止时间 2 s。

2.2.5 DNA 电化学生物传感器的制备

玻碳电极依次用 1.0, 0.3 和 0.05 μm 的 α-Al₂O₃ 抛光至呈镜面, 二次水洗涤、超

声波清洗后,将电极在 $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7.40的磷酸缓冲溶液中恒电位(+0.50 V)氧化1 min,然后用大量二次水冲洗电极表面。取20 μL EDC和NHS按1:1的比例混合,将混合溶液滴于倒置的玻璃碳电极表面,活化电极,待电极表面的混合液在红外灯下烘干后,用二次水多次冲洗电极。然后将20 μL dsDNA ($C_{\text{dsDNA}} = 4.68 \times 10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)或ssDNA ($C_{\text{ssDNA}} = 3.19 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)均匀地滴于活化后的玻璃碳电极表面,电极在红外灯下烘干后,将其用二次水和Tris-HCl溶液 (pH 7.0) 冲洗片刻,以除去吸附的dsDNA或DNA探针。

2.2.6 修饰后玻璃碳电极上 DNA 的杂交

将修饰后的电极浸入含有一定浓度互补 S_2 或非互补的 S_3 的 Tris-HCl (pH 7.0) 缓冲溶液中,于 $40\text{ }^\circ\text{C}$ 下搅拌反应 1 h。然后用大量的二次蒸馏水和 Tris-HCl 溶液 (pH 7.0) 冲洗电极以除去电极表面吸附的互补 ssDNA。

2.2.7 指示剂的嵌入

将 S_1 修饰玻璃碳电极, dsDNA 修饰玻璃碳电极,与互补 S_2 杂交以后的玻璃碳电极和与非互补的 S_3 杂交以后的玻璃碳电极分别浸入含有 $6.7 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $[\text{CdL}_2]^{2+}$ 的 NaAc-HAc 缓冲液中,在 $40\text{ }^\circ\text{C}$ 下搅拌 10 min。将电极取出,用二次水冲洗数次以除去电极表面吸附的 $[\text{CdL}_2]^{2+}$ 。

2.2.8 电化学测定

用微分脉冲伏安法测定杂交现象。在 $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NaAc-HAc 缓冲溶液中,以嵌合好的玻璃碳电极为工作电极, Pt 丝为对电极, Ag/AgCl 为参比电极。微分脉冲伏安法的条件:起始电位-1.1 V,终止电位-0.4 V,脉冲幅度 0.05 V,脉冲宽度 0.05 s,脉冲周期 0.2 s,取样间隔 0.001 V,静止时间 2 s。大约在-0.82 V 附近检测到 $[\text{CdL}_2]^{2+}$ 的还原峰。

2.3 结果与讨论

2.3.1 配合物的结构

依照文献^[26]合成了配合物 $[\text{CdL}_2]^{2+}$ 并且表征了其单晶结构。配合物 $[\text{CdL}_2]^{2+}$ 的结构如图 2-1 所示,配合物 $[\text{CdL}_2]^{2+}$ 单晶的原子位次编排透视图如图 2-2 所示。它属于单斜晶系,由图 2-2 可以看出, Cd(II)原子位于二维旋转轴上,与苯甲酰胺配体上的两个氧原子,两个氮原子和水分子上的两个氧原子形成六配位结构,两个水分子也处于此二维旋转轴上。此配合物的几何构型是八面体,两个硝酸根阴离

子位于八面体的外部使整个配合物呈电中性。由于氮原子提供的非键电子对，使此种氨基化合物的 C-N 键具有部分双键的性质^[27]。像我们预想的一样，苯甲酰胺螯合物不是平面结构，两个芳香环之间的二面角为 60.6 (1)°。在此单晶结构中，水分子参与形成了 O—H···O 氢键。此种氢键与硝酸根离子相互作用形成 N—H···O，进一步加强了三维网状结构的稳定性。

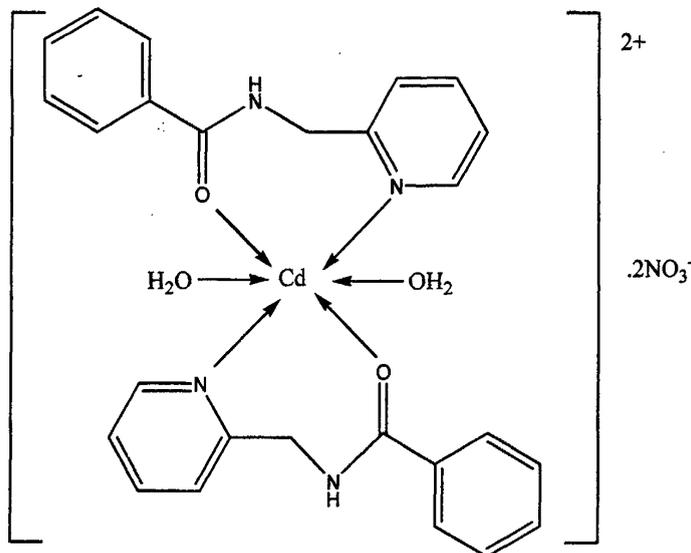


图 2-1 $[CdL_2]^{2+}$ 的结构式

Fig. 2-1 The formula of $[CdL_2]^{2+}$

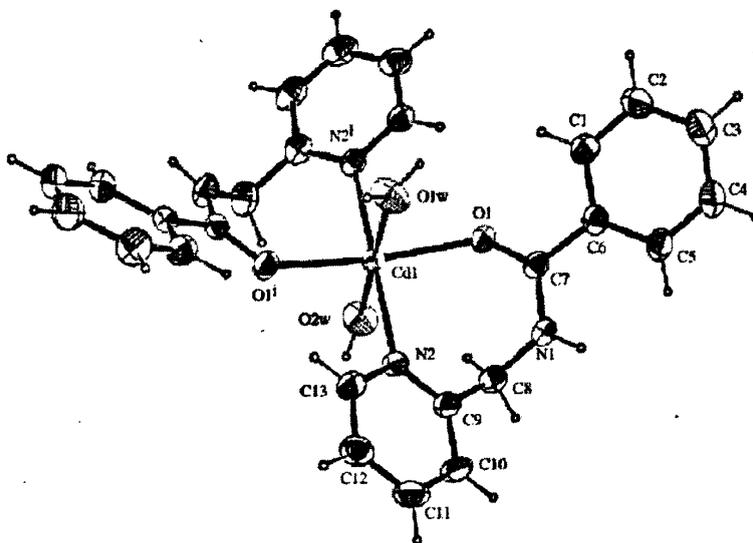


图 2-2 $[CdL_2]^{2+}$ 的原子位次编排透视图

Fig. 2-2 The molecular structure for $[CdL_2]^{2+}$ with the atomic numbering scheme.

2.3.2 [CdL₂]²⁺与 dsDNA 相互作用的荧光光谱研究

图 2-3 所示为 [CdL₂]²⁺ 与 dsDNA 相互作用的荧光光谱曲线。曲线 1 和曲线 2 分别代表不存在和存在 dsDNA 时 [CdL₂]²⁺ 的荧光信号, 从图中可以看出, [CdL₂]²⁺ 在 523 nm 处有比较强的荧光信号(曲线 1), 当 [CdL₂]²⁺ 的溶液中加入 dsDNA 以后发现 [CdL₂]²⁺ 的荧光强度明显下降(曲线 2), 证明 [CdL₂]²⁺ 嵌入到 dsDNA 的双螺旋结构中。

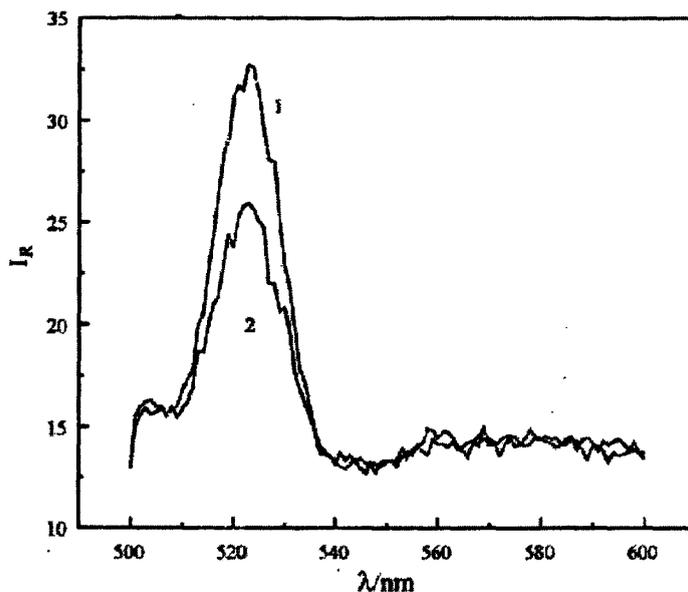


图 2-3 [CdL₂]²⁺与 DNA 相互作用的荧光光谱

Fig. 2-3 Fluorescence spectrum of [CdL₂]²⁺

$C_{[CdL_2]^{2+}} / \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$: 1.00×10^{-6} , $C_{DNA} / \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$: (1) 0 (2) 2.48×10^{-3}

2.3.3 [CdL₂]²⁺与 dsDNA 相互作用的电化学行为

[CdL₂]²⁺ 与 dsDNA 相互作用的电化学行为情况如图 2-4 所示。图 2-4 中曲线 1 为 $3 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ [CdL₂]²⁺ 在 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaAc-HAc 缓冲溶液液中的循环伏安图 (CV), 图中可以观测到一个比较明显的阴极峰, 峰电位(E_{pc})为 -0.85 V 。曲线 2 为加入 dsDNA 以后 [CdL₂]²⁺ 的循环伏安曲线, 与曲线 1 相比峰电流降低, E_{pc} 正移。式电位 (E^\ominus) 的移动和峰电流的降低证明生成了一种新的复合物, Bard^[28] 等人报道了一种区分小分子与 DNA 相互作用的不同方式的理论, 当小分子与 DNA 发生作用时, 如果 E^\ominus 向负方向偏移, 则小分子与 DNA 发生静电作用; 如果 E^\ominus 向正方向偏移, 则发生嵌插作用。因此可初步推断 [CdL₂]²⁺ 与 dsDNA 发生嵌插作用,

$[\text{CdL}_2]^{2+}$ 嵌插到 dsDNA 的双螺旋结构中。

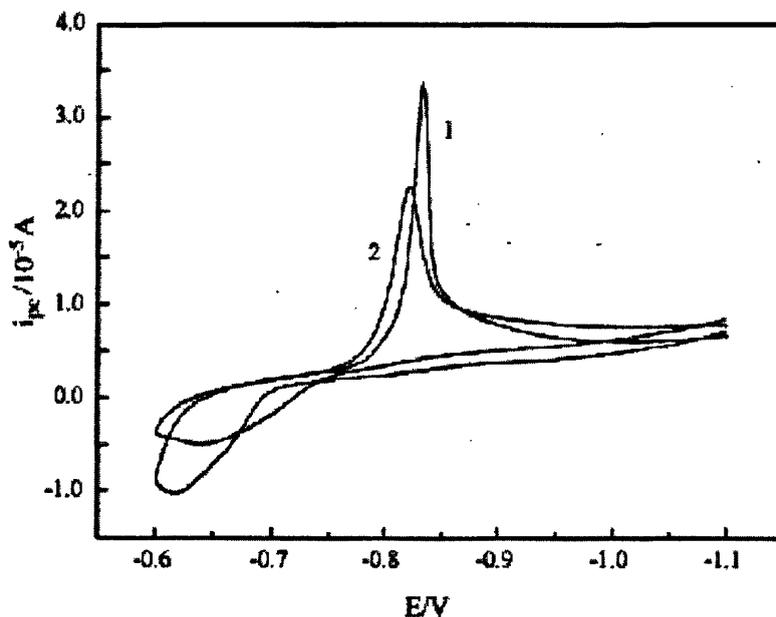


图 2-4 $[\text{CdL}_2]^{2+}$ 在加入不同浓度 DNA 中的循环伏安图

Fig. 2-4 The cyclic voltammograms curves of the interaction between $[\text{CdL}_2]^{2+}$ and DNA
 $C_{[\text{CdL}_2]^{2+}}/\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$: 3.00×10^{-4} , $C_{\text{DNA}}/\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$: (1) 0 (2) 4.68×10^{-4}

2.3.4 pH 对 $[\text{CdL}_2]^{2+}$ 与 dsDNA 相互作用的影响

在含有 $5 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} [\text{CdL}_2]^{2+}$, $1.17 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ dsDNA 的 NaAc-HAc 缓冲溶液中, 在 pH 5.5~7.8 范围内考察了 pH 与 $[\text{CdL}_2]^{2+}$ 的还原峰电流(i_{pc})的关系。发现随着 pH 的增大, Δi_{pc} 的值先是增加, 当 pH 为 7.02 时, Δi_{pc} 达到最大值, 之后 Δi_{pc} 逐渐降低。因此该实验选择最佳 pH 为 7.02, 见图 2-5

2.3.5 反应时间对 $[\text{CdL}_2]^{2+}$ 与 dsDNA 相互作用的影响

$[\text{CdL}_2]^{2+}$ 与 dsDNA 作用时间对 $[\text{CdL}_2]^{2+}$ 的还原峰电流有明显的影 响。峰电流的变化值随作用时间的延长而升高, 大约在 8 min 后达到稳定值, 表明 $[\text{CdL}_2]^{2+}$ 与 dsDNA 的作用已经达到平衡。因此, $[\text{CdL}_2]^{2+}$ 与 dsDNA 充分作用的时间为 8 min, 见图 2-6。因此, 我们选择 8 min 为最佳反应时间。

2.3.6 扫速对 $[\text{CdL}_2]^{2+}$ 与 dsDNA 相互作用的影响

图 2-7 是 $[\text{CdL}_2]^{2+}$ 还原峰电流 i_{pc} 与扫速平方根 $v^{1/2}$ 的关系曲线, 从曲线反应的

影响情况来看, 在 0.01 到 $0.5 \text{ V}\cdot\text{s}^{-1}$ 的扫描范围内, 还原峰电流与扫速的平方根不呈线性关系, 而是随扫速的增加曲线向上弯曲。图 2-8 是 $[\text{CdL}_2]^{2+}$ 还原峰电流 i_{pc} 与扫速 v 的关系曲线, 在上述扫描范围内峰电流与扫速也不呈线性关系, 此现象表明, $[\text{CdL}_2]^{2+}$ 的电还原过程不仅受扩散控制, 同时也受电极表面的吸附作用的影响。

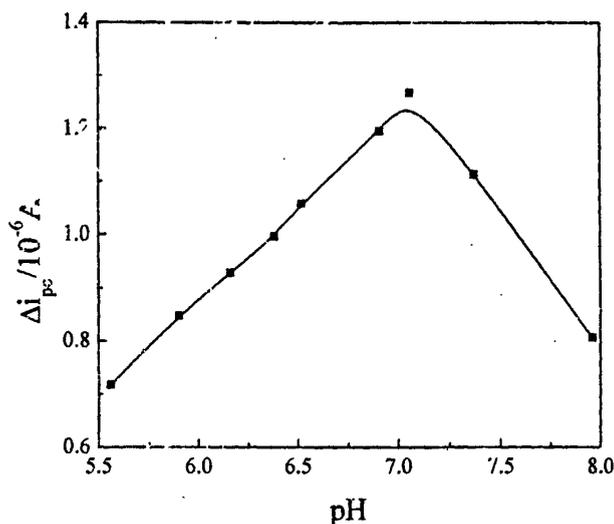


图 2-5 pH 对还原峰电流降低值 Δi_{pc} 的影响

Fig. 2-5 Influence of pH on Δi_{pc} (the difference of reduction peak current in the absence and presence of dsDNA). $C_{\text{dsDNA}} = 1.17 \times 10^{-4}$; $C_{[\text{CdL}_2]^{2+}} = 5 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

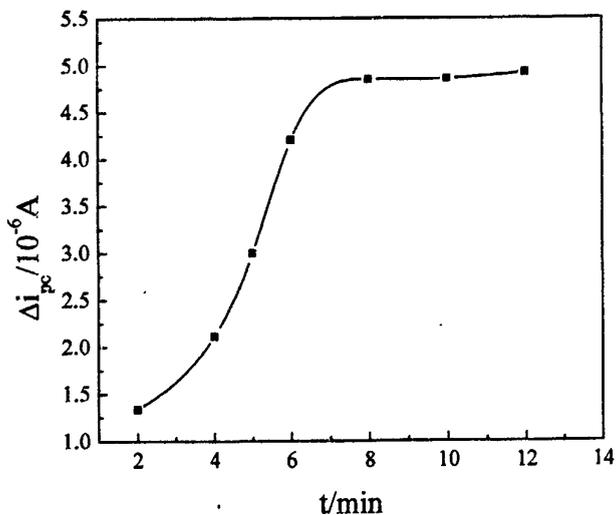


图 2-6 反应时间对还原峰电流降低值 Δi_{pc} 的影响

Fig. 2-6 Influence of reaction time on Δi_{pc} (the difference of reduction peak current in the absence and presence of dsDNA). $C_{dsDNA} = 1.17 \times 10^{-4}$; $C_{[CdL_2]^{2+}} = 5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

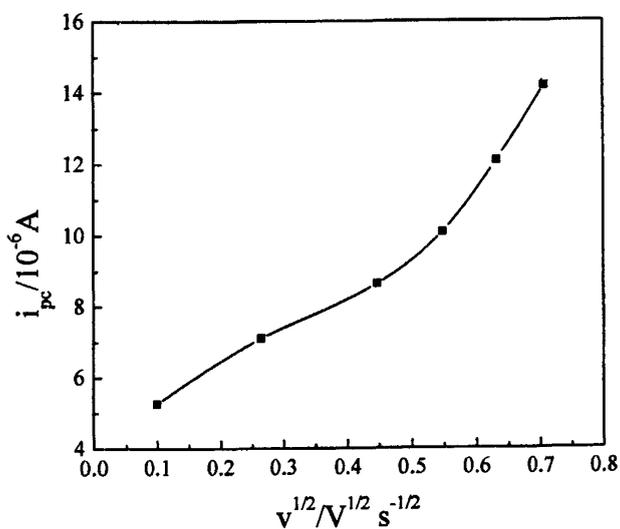


图 2-7 $[CdL_2]^{2+}$ 的还原峰电流与扫速的平方根的关系曲线

Fig. 2-7 The relationship curve of the reduction peak of $[CdL_2]^{2+}$ and the square root of scan rate.

$C_{[CdL_2]^{2+}} = 5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

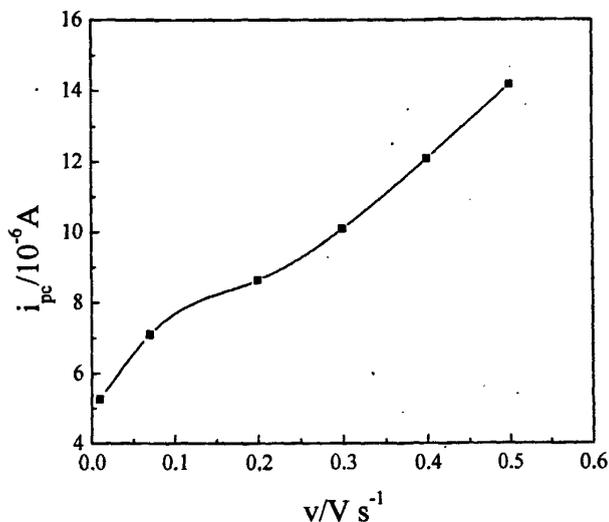
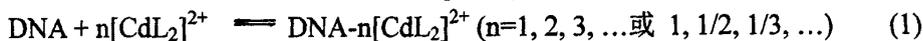


图 2-8 $[CdL_2]^{2+}$ 的还原峰电流与扫速的关系曲线

Fig. 2-8 The relationship curve of the reduction peak of $[CdL_2]^{2+}$ and scan rate. $C_{[CdL_2]^{2+}} = 5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot L^{-1}$.

2.3.7 $[CdL_2]^{2+}$ 与 dsDNA 相互作用的结合比 n 及结合常数

在研究 $[CdL_2]^{2+}$ 与 dsDNA 相互作用的结合比 n 及结合常数之前, 假设 $[CdL_2]^{2+}$ 与 dsDNA 只形成一种结合物^[29] $DNA-n[CdL_2]^{2+}$, 方程如下。



结合常数由下式得出:

$$\beta = \frac{[DNA - n[CdL_2]^{2+}]}{[DNA][[CdL_2]^{2+}]^n} \quad (2)$$

可以推出下列方程:

$$\frac{1}{\Delta i_{pc}} = \frac{1}{\Delta i_{pc, \max}} + \frac{1}{\beta \Delta i_{pc, \max} [[CdL_2]^{2+}]^n} \quad (3)$$

其中 $[DNA]$ 代表 dsDNA 的平衡浓度, Δi_{pc} 和 $\Delta i_{pc, \max}$ 分别代表加入 DNA 前后 $[CdL_2]^{2+}$ 的还原峰电流的差值和最大差值, $[[CdL_2]^{2+}]$ 代表 $[CdL_2]^{2+}$ 的平衡浓度。

对于不同的 n 值, 就有不同的 Δi_{pc}^{-1} 与 $[[CdL_2]^{2+}]^{-n}$ 关系曲线。根据方程(3), 取

合适的 n 值, 则 $\Delta i_{pc}^{-1} \sim [CdL_2]^{2+}]^{-n}$ 作图应为一条直线, 由该直线的斜率和截距可求得结合常数 β , 其 n 值则为结合比。

图 2-9 为有无 dsDNA 存在时, 改变 $[CdL_2]^{2+}$ 浓度所得的还原峰电流 (i_{pc}) 与 $[CdL_2]^{2+}$ 分析浓度的关系曲线。图 2-9 中曲线 1 为 $[CdL_2]^{2+}$ 的还原峰电流与其分析浓度的关系曲线。曲线 2 为加入 $4.68 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ dsDNA 后, $[CdL_2]^{2+}$ 的还原峰电流与其分析浓度的关系曲线。曲线 3 为曲线 1 与曲线 2 的电流差值即 (Δi_{pc} , $\Delta i_{pc} = i_{pc1} - i_{pc2}$) 与 $[CdL_2]^{2+}$ 的分析浓度的关系曲线。

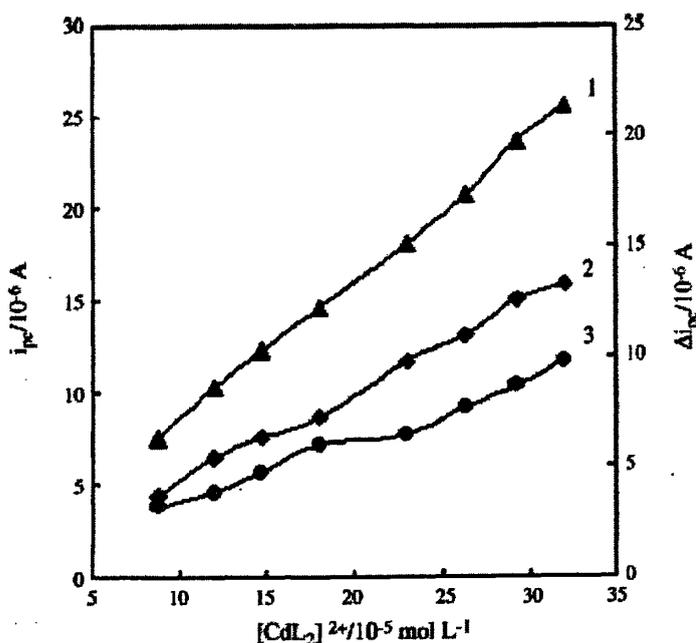


图 2-9 $[CdL_2]^{2+}$ 的还原峰电流以及峰电流的降低值与 $[CdL_2]^{2+}$ 浓度的关系曲线

Fig. 2-9 Curves of reduction peak current of $[CdL_2]^{2+}$ (i_{pc}), and Δi_{pc} versus analytical concentration of $[CdL_2]^{2+}$. (1) $C_{dsDNA}: 0$; (2) $C_{dsDNA}: 4.68 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$;
(3) $\Delta i_{pc} = i_{pc1} - i_{pc2}$

图 2-10 分别绘出了 $\Delta i_{pc}^{-1} \sim [CdL_2]^{2+}]^{-1/2}$ 、 $\Delta i_{pc}^{-1} \sim [CdL_2]^{2+}]^{-1}$ 、以及 $\Delta i_{pc}^{-1} \sim [CdL_2]^{2+}]^{-2}$ 的关系曲线。当 $n = 0.5$ 时, $\Delta i_{pc}^{-1} \sim [CdL_2]^{2+}]^{-1/2}$ 为一条直线 ($\gamma = 0.9989$), 而当 $n = 1$ 或 $n = 2$ 时, 曲线明显向下弯曲。因此, $[CdL_2]^{2+}$ 与 dsDNA 形成了 2:1 的络合物。从直线的斜率和截距计算出结合常数 β 为 $25.56 \text{ L}^{1/2} \cdot \text{mol}^{-1/2}$ 。于是得出方程式为: $\text{DNA} + 1/2[CdL_2]^{2+} \rightleftharpoons \text{DNA} \cdot 1/2[CdL_2]^{2+}$ 。

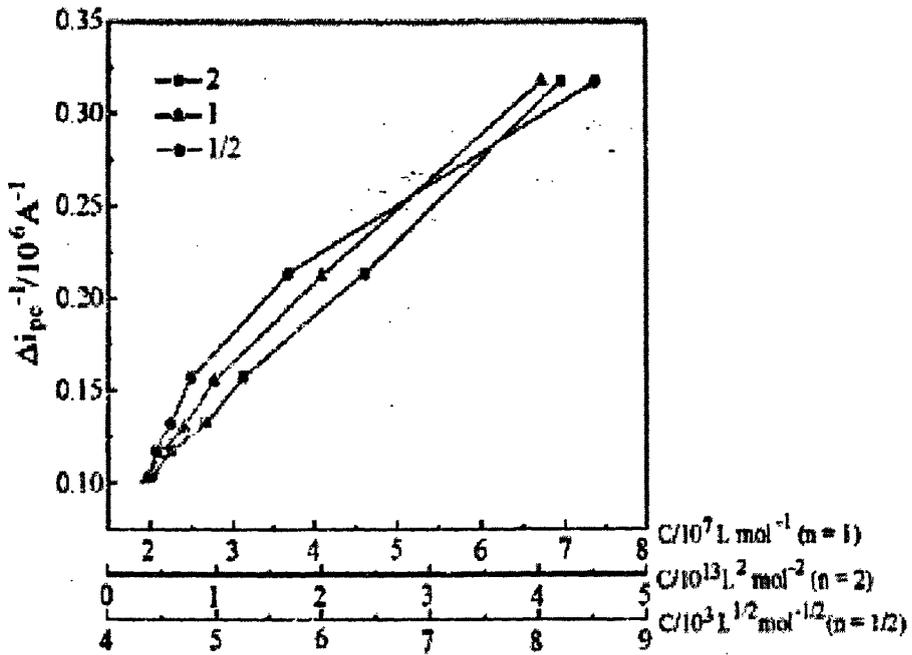


图 2-10 Δi_{pc}^{-1} 与 $[CdL_2]^{2+}$ 的关系图

Fig. 2-10 Curves of Δi_{pc}^{-1} versus $C_{[CdL_2]^{2+}}^n$, $n = 1/2, 1,$ and $2.$

2.3.8 DNA 电化学传感器的选择性

DNA 电化学传感器包括探针 ssDNA 在电极表面的固定和杂交指示剂电化学信号的检测两部分。本实验选用较为灵敏的微分脉冲伏安法考察 DNA 修饰玻碳电极的选择性。图 2-11 中四条曲线分别为 S_1 修饰玻碳电极(曲线 1)、与 S_2 杂交后的 S_1 修饰的玻碳电极(S_1 - S_2 /GCE, 曲线 2)、天然 dsDNA 修饰的玻碳电极(dsDNA/GCE 曲线 3)及与非互补 S_3 杂交后的 S_1 修饰的玻碳电极(曲线 4)作为工作电极, 与 $[CdL_2]^{2+}$ 溶液嵌合后在 NaAc-HAc 缓冲溶液中得到的微分脉冲伏安曲线。 S_1 修饰电极的微分脉冲伏安曲线几乎没有电流响应(曲线 1), 而杂交了互补链 S_2 的 S_1 修饰电极在嵌合 $[CdL_2]^{2+}$ 一定时间在 -0.82 V 左右出现了与裸玻碳电极在 $[CdL_2]^{2+}$ 溶液中峰电位相同的还原峰(曲线 2), 其峰电流为: 3.079×10^{-7} A。与 S_1 修饰的玻碳电极在 $[CdL_2]^{2+}$ 的 NaAc-HAc 缓冲溶液中的电流响应相比, 杂交后修饰的电极的电流响应比较明显, 这是因为 S_1 与 S_2 互补, 从而在电极表面形成了 dsDNA, 指示剂在电极表面堆积后, $[CdL_2]^{2+}$ 分子六配位结构嵌插到 dsDNA 碱基对之间所致。当天然 dsDNA 修饰电极嵌合指示剂后也出现了与裸玻碳电极在 $[CdL_2]^{2+}$ 溶液中峰位相同的还原峰(曲线 3), 其峰电流为 2.645×10^{-7} A, 电流响应

与 S_1 - S_2 杂交后形成的修饰电极的电流信号相比较小, 原因可能是天然 DNA 的碱基序列较长, 在电极表面展开较差, 指示剂与其较难嵌插所致。从曲线 4 可以看出 S_1 修饰电极杂交了非互补的 S_3 作为工作电极嵌合指示剂后几乎没有电流相应, 因为 S_1 与 S_3 不互补无法形成 dsDNA, 从而指示剂 $[CdL_2]^{2+}$ 无法嵌插。换句话说, 此种 DNA 电化学传感器只能检测与探针互补的 DNA, 具有良好的选择性。

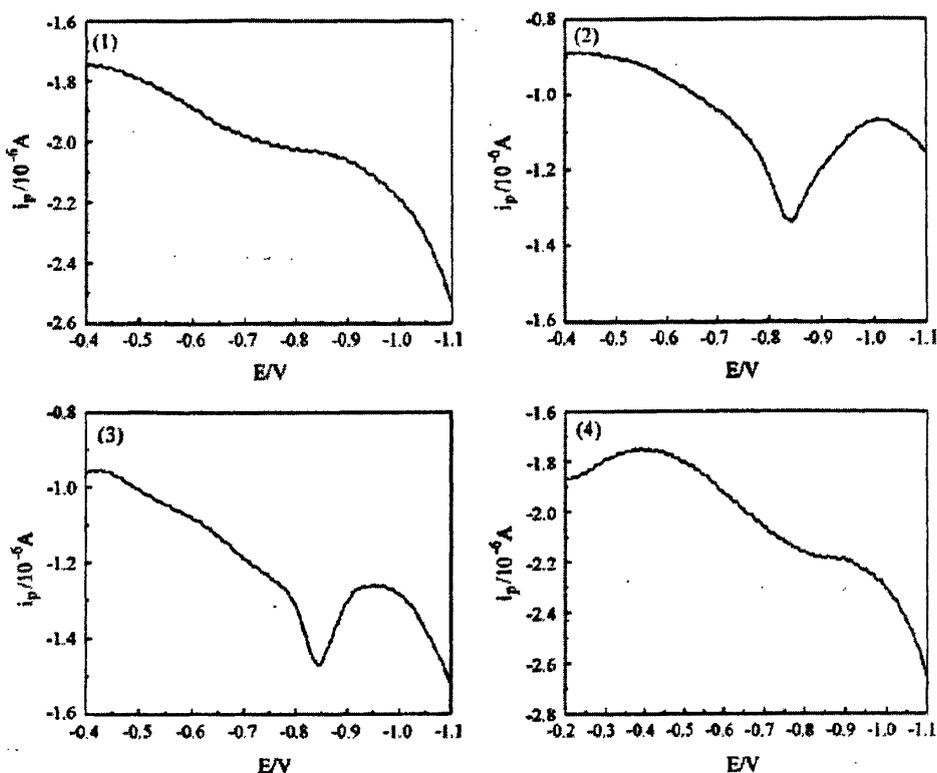


图 2-11 修饰不同物质的玻碳电极与 $[CdL_2]^{2+}$ 溶液嵌合后在 NaAc-HAc 缓冲溶液中的微分脉冲曲线 (1) S_1 修饰电极; (2) S_1 - S_2 杂交后的修饰电极; (3) dsDNA 修饰电极; (4) 非互补 S_1 - S_3 杂交后的修饰电极

Fig. 2-11 The DPV curves of S_1 -modified (1), S_1 - S_2 hybridized (2), dsDNA-modified (3), S_1 - S_3 hybridized (4) GCE.

2.3.9 定量检测目标 ssDNA

随着溶液中 S_2 浓度的增加, 在一定的浓度范围内, 发现峰电流逐渐增加。这一发现使 S_2 修饰的玻碳电极可以定量的检测靶 ssDNA。与空白相比峰电流的增加值与溶液中靶 ssDNA 的浓度在 $1.01 \times 10^{-8} \sim 1.62 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内呈线性关系 (图 2-12), 线性方程为: $\Delta i_p = 0.1116C + 3.0365 \times 10^{-8}$ ($C, \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $\Delta i_p, \text{ A}$), 相关系数为 0.9962, 检测限为 $7.19 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($3\sigma, n = 11$)。

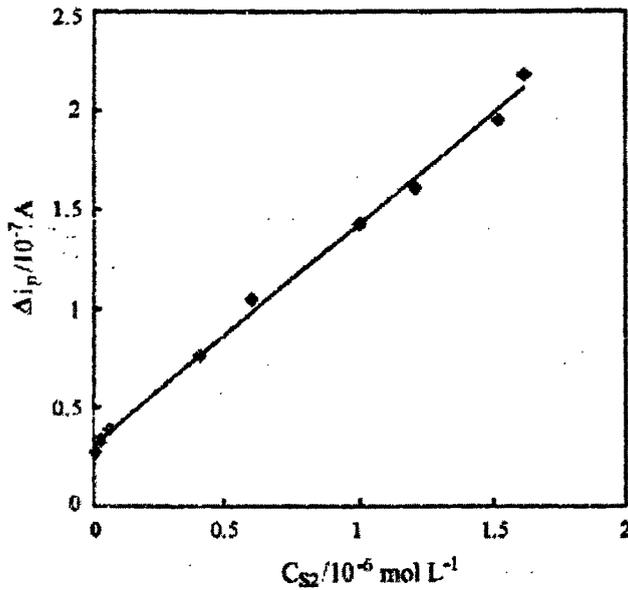


图 2-12 峰电流的增加值与目标 ssDNA 浓度的关系曲线

Fig. 2-12 The increase of peak current (Δi_p) versus concentration of target ssDNA (S_2).

2.4 本章小结

本文讨论了配合物 $[\text{CdL}_2]^{2+}$ 的结构并且通过荧光光谱法和伏安法研究了 $[\text{CdL}_2]^{2+}$ 与鲑鱼精 dsDNA 的相互作用, 结果表明, $[\text{CdL}_2]^{2+}$ 可以嵌插到 dsDNA 碱基对之间, 它们的最佳反应 pH 为 7.02, 最佳反应时间为 8 min, $[\text{CdL}_2]^{2+}$ 与 dsDNA 的结合比为 2:1, 结合常数为 $25.56 \text{ L}^{1/2} \cdot \text{mol}^{-1/2}$ 。以 $[\text{CdL}_2]^{2+}$ 作为一种新的电活性指示剂, 通过共价键合法发展了一种新型的检测乙肝病毒片段的 DNA 电化学传感器, 通过对裸玻碳电极、ssDNA 修饰玻碳电极、与 S_2 杂交后的 S_1 修饰玻碳电极(即 dsDNA 修饰玻碳电极)分别嵌合杂交指示剂后微分脉冲伏安曲线的比较, 说明此种传感器具有良好的选择性, 此 DNA 传感器对靶 ssDNA 的检测范围为 $1.01 \times 10^{-8} \sim 1.62 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 相关系数为 0.9962。检测限为 $7.19 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。这种新型的指示剂和由此发展起来的 DNA 电化学传感器在杂交信号的转变, 新型药物的设计和疾病的诊断等领域具有十分重大的应用前景。

参考文献

- [1] Landergren U., Kaiser R., Caskey C.T., Hood L., DNA diagnostics-molecular techniques and automation[J], *Science*, 1988, 242: 229–237
- [2] Pinar K., Burcu M., Aysin Z., et al, Electrochemical DNA biosensor for the detection and discrimination of herpes simplex Type I and Type II viruses from PCR amplified real samples[J], *Anal. Chim. Acta*, 2004, 518: 69–76
- [3] Millan K.M., Mikkelsen S.R., Sequence-selective biosensor for DNA based on electroactive hybridization indicators[J], *Anal. Chem.*, 1993, 65: 2317–2323
- [4] Pankaj S., Werner G.K., Direct electrochemical detection of purine- and pyrimidine-based nucleotides with sinusoidal voltammetry[J], *Anal. Chem.*, 1997, 69: 3552–3557
- [5] Armistead P.M., Thorp H.H., Modification of indium tin oxide electrodes with nucleic acids: detection of attomole quantities of immobilized DNA by electrocatalysis[J], *Anal. Chem.*, 2000, 72: 3764–3770
- [6] Ohmichi T., Kawamoto Y., Wu P., et al, DNA-based biosensor for monitoring pH *in Vitro* and in living cells[J], *Biochemistry*, 2005, 44: 7125–7130
- [7] Millan K.M., Spurmanis A.J., Mikkelsen S.R., Covalent immobilization of DNA onto glassy carbon electrodes[J], *Electroanal.*, 1992, 4: 929–932
- [8] Millan K.M., Saraullo A., Mikkelsen S.R., Voltammetric DNA biosensor for cystic fibrosis based on a modified carbon paste electrode[J], *Anal. Chem.*, 1994, 66: 2943–2948
- [9] Hashimoto K., Ito K., Ishimori Y., Sequence-specific gene detection with a gold electrode modified with DNA probes and an electrochemically active dye[J], *Anal. Chem.*, 1994, 66: 3830–3833
- [10] Hashimoto K., Ito K., Ishimori Y., Novel DNA sensor for electrochemical gene detection[J], *Anal. Chim. Acta*, 1994, 286: 219–224
- [11] Paleček E., Past, present and future of nucleic acids electrochemistry[J], *Talanta*, 2002, 56: 809–819
- [12] Kostecka P., Havran L., Pivonkova H., et al, Voltammetry of osmium- modified DNA at a mercury film electrode: Application in detecting DNA hybridization[J], *Bioelectrochemistry*, 2004, 63: 245–248
- [13] Wang S.F., Wang W., Cai H.C., Recognition and detection of dsDNA at a thionalid self-assembled monolayer modified gold electrode[J], *Sens. Actuator B-Chem.*, 2005, 104:

8-14

- [14] Kara P., Kerman K., Ozkan D., et al, Label-free and label based electrochemical detection of hybridization by using methylene blue and peptide nucleic acid probes at chitosan modified carbon paste electrodes[J], *Electroanal.*, 2002, 14: 1685–1690
- [15] Poumaghi-Azar M.H., Hejazi M.S., Alipour E., Developing an electrochemical deoxyribonucleic acid (DNA) biosensor on the basis of human interleukine-2 gene using an electroactive label[J], *Anal. Chim. Acta*, 2006, 570: 144–150
- [16] Wang J., Cai X., Rivas G., et al, Stripping potentiometric transduction of DNA hybridization processes[J], *Anal. Chim. Acta*, 1996, 326: 141–147
- [17] Wang J., Rivas G., Cai X., et al, Sequence-specific electrochemical biosensing of *M. tuberculosis* DNA[J], *Anal. Chim. Acta*, 1997, 337: 41–48
- [18] Wang J., Rivas G., Cai X., Screen-printed electrochemical hybridization biosensor for the detection of DNA sequences from the *Escherichia coli* pathogen[J], *Electroanal.*, 1997, 9: 395–398
- [19] Palecek E., Tomshik M., Stankova V., et al, Chronopotentiometric stripping of DNA at mercury electrodes[J], *Electroanal.*, 1997, 9: 990–997
- [20] Carter M.T., Bard A.J., Voltammetric studies of the interaction of tris(1,10-phenanthroline)cobalt(III) with DNA[J], *J. Am. Chem. Soc.*, 1987, 109: 7528–7530
- [21] Johnston D.H., Glasgow K.C., Thorp H.H., Electrochemical measurement of the solvent accessibility of nucleobases using electron transfer between DNA and metal complexes[J], *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, 117: 8933–8938
- [22] Thorp H.H., Cutting out the middleman: DNA biosensors based on electrochemical oxidation[J], *Trends Biotechnol.*, 1998, 16: 117–121
- [23] Ju H.X., Ye Y.K., Zhao J.H., et al, Hybridization biosensor using di(2,2'-bipyridine)osmium (III) as electrochemical indicator for detection of polymerase chain reaction product of hepatitis B virus DNA[J], *Anal. Biochem.*, 2003, 313: 255–261
- [24] Zhang S.S., Niu S.Y., Qu B., et al, Studies on the interaction mechanism between hexakis(imidazole) manganese(II) terephthalate and DNA and preparation of DNA electrochemical sensor[J], *J. Inorg. Biochem.*, 2005, 99: 2340–2347
- [25] Wu J., Zou Y.H., Li X.L., et al, A biosensor monitoring DNA hybridization based on polyaniline intercalated graphite oxide nanocomposite[J], *Sens. Actuator B-Chem.*, 2005, 104: 43–49
- [26] Zhang X.R., Jia J.L., Li X.M., et al, Diaquabis[*N*-(2-pyridylmethyl) benzamide-κ²*N,O*]cadmium(II) dinitrate[J], *Acta Cryst. E*, 2006, 62: m185–m187

- [27] Fekner T., Gallucci J., Chan M.K., Ruffling-induced chirality: synthesis, metalation, and optical resolution of highly nonplanar, cyclic, benzimidazole-based ligands[J], *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126: 223–236 .
- [28] Carter M. T., Rodriguez M., Bard A. J., Voltammetric studies of the interaction of metal chelates with DNA. 2. tris-chelated complexes of cobalt(III) and iron(II) with 1,10-phenanthroline and 2,2'-bipyridine[J], *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, 111: 8901–8911
- [29] Qu F., Li N.Q., Jiang Y.Y., Electrochemical studies of porphyrin interacting with DNA and determination of DNA[J], *Anal. Chim. Acta*, 1997, 344: 97–104

第三章 二巯基苯并噻唑自组装金电极检测和 识别ssDNA的电化学研究

3.1 引言

随着医学和生物技术的发展,在基因转染,遗传疾病的诊断,不同基因片段的识别方面,对目标 ssDNA 的检测引起人们越来越大的兴趣^[1]。到目前为止,已经发展了很多种检测目标 ssDNA 的方法,如荧光检测^[2],电化学检测^[3,4],表面等离子体共振检测^[5,6],石英晶体微天平检测等^[7-9]。在上述方法中,电化学方法因其设计简便,价格低廉,灵敏度高等特点备受人们关注。因此构建新型、稳定、高效的 DNA 电化学传感器具有非常重要的意义^[10-14]。

由于自组装膜具有制备简单,功能性多样等特点,它已经成为对分子表面进行修饰的最普遍的方法。因为巯基类化合物能在金电极表面形成一层有序稳定的自组装单层膜,所以巯基类的自组装膜最受人关注^[15]。目前,杂环类的巯基化合物在金电极表面形成自组装膜的研究已经有很多。二巯基苯并噻唑(MBT)就是一种杂环类的巯基化合物,虽然它没有长程的烷基链,但是它也可以在金电极表面形成非常有序稳定的单分子层。MBT自组装膜已经被广泛的用于金属防腐蚀和制备纳米材料方面,例如: Tan等人^[16]报道说在铜膜上大面积自组装MBT可以防腐蚀,MBT层可以有效隔绝氧气,在酸性介质中可以防止铜被腐蚀。Sandhyarani和Pradeep^[17]制备了MBT单分子层保护的纳米金和银分子簇,与烷烃单分子层相比,MBT单分子层有更高的热稳定性。Tan等人^[18]通过MBT作稳定剂制备了银溶胶。由于MBT单分子膜的钝化作用,制备的银溶胶有比较高的稳定性。另外,以MBT单分子膜为基础制备的生物传感器已经被用来检测无机和有机物质,研究电子转移过程和电极表面反应的动力学原理^[19-22]。例如: Wang等人^[23]研究了不同pH值的溶液中MBT分子层对 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 氧化还原电对的“开关”效应。Jun和Beng^[24]研究了MBT层电子转移的动力学原理。结果表明,像 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 和 $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3-/2-}$ 这样的氧化还原探针,在酸性介质中可以充分的在MBT单分子层中扩散,但是,在中性介质中MBT层可以有效的阻止探针分子电对在金电极表面的电子转移。

目前许多固定 ssDNA 的方法,如共价键合法,电聚合法和生物素-亲和素结合的方法相对来说比较昂贵、复杂、耗时^[25]。在本章中,发展了一种以 MBT 修饰金电极(Au-MBT)为工作电极检测 DNA 的电化学传感器,并且应用此电极定量的检测了目标 ssDNA。MBT 能与 dsDNA 嵌插结合,所以杂交以后形成的 dsDNA

可以使峰电流增加，峰电流增加的程度反映了杂交的程度，在一定的浓度范围内它们之间呈线性关系。MBT 不能与 ssDNA 嵌插结合，因此可以通过此种传感器选择性区分 dsDNA 和 ssDNA。

3.2 实验部分

3.2.1 仪器

CHI 832B 电化学分析仪（上海辰华仪器厂）；三电极系统：裸金电极或 MBT 修饰的金电极为工作电极，饱和甘汞（SCE）电极为参比电极，铂丝作为辅助电极；BR(pH, 7.00)缓冲溶液($0.04 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ CH}_3\text{COOH} + 0.04 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ H}_3\text{PO}_4 + 0.04 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ H}_3\text{BO}_3$)作为支持电解质。

3.2.2 试剂

除非特别说明，实验所有的试剂和溶剂都为分析纯，水均为二次蒸馏水。MBT 购于Belglum公司（美国）；鲑鱼精双链DNA ($10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)，上海华舜生物工程有限公司，其纯度以 $A_{260}/A_{280}>1.8$ 衡量，浓度用260 nm处的吸光度来确定 ($\epsilon=6600 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)；21个碱基的探针ssDNA(ssDNA-A)，目标ssDNA (ssDNA-B, 与ssDNA-A互补)和非互补的ssDNA(ssDNA-C, 四个碱基非互补和ssDNA-D, 一个碱基非互补)，碱基序列如下：

ssDNA-A: 5'-GAG GAG TTG GGG GAG CAC ATT-3'；

ssDNA-B: 5'-AAT GTG CTC CCC CAA CTC CTC-3'；

ssDNA-C: 5'-AAT GTC CTC ICC CGA CTT CTC-3'。

ssDNA-D: 5'-AAT GTG CTC CGC CAA CTC CTC-3'；

3.2.3 制备和表征二巯基苯并噻唑自组装金电极 (Au-MBT)

将裸金电极浸入Piranha溶液（30% H_2O_2 与浓 H_2SO_4 的混合溶液，体积比为3:7）中5 min，然后依次用无水乙醇和二次蒸馏水各超声清洗1 min，然后再用0.05 μm 的氧化铝抛光，将抛光后的电极放入 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的MBT乙醇溶液中组装36小时形成Au-MBT自组装膜，然后将组装好的电极在BR缓冲溶液(pH=7.00)中、0.0-0.8 V电位范围内用 $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ 的速度进行循环伏安扫描以去除化学吸附的物质。用上述同样的方式依次组装三根电极。

我们用两种方法对组装电极进行了表征，第一种方法通过分别记录组装前后的电极在BR缓冲溶液和BR缓冲溶液与 $5 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 铁氰化钾溶液中循环伏安曲线的方法，表征了金电极组装前后的差别。证明了此种组装方法的可行性。第

二种方法通过组装前后扫描电镜的差别证明了此种组装方法的可行性。

3.2.4 检测目标 ssDNA

将组装电极浸入 $0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲溶液(PBS, $\text{pH} = 7.00$)和 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠 (NaCl) 的混合溶液中, 分别加入 $3.0 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 探针 ssDNA-A 和不同浓度的目标 ssDNA-B, 在 40°C 下搅拌杂交 50 min。杂交完成以后, 记录杂交以后的微分脉冲曲线, 通过杂交前后微分脉冲曲线的不同, 表明 MBT 嵌插入了杂交形成的 dsDNA 的双螺旋之中。

3.2.5 Au-MBT 电极的重现性, 再生性和稳定性

按照同样的组装方法, 通过平行组装三根电极的方法检测了 Au-MBT 电极的重现性, 在 $0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲溶液(PBS, $\text{pH} = 7.00$)和 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠 (NaCl) 的混合溶液中加入 $3.0 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 探针 ssDNA-A 和 $1.34 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ssDNA-B, 在 40°C 下搅拌杂交 50 min, 杂交完以后, 记录三根电极在杂交溶液中的微分脉冲信号。

杂交完以后的组装电极在 90°C 的二次水中浸泡 1 min, 然后迅速的将该电极浸入冰水中, 1 min 后取出, 检测此电极的微分脉冲信号。再将此电极进行杂交, 再用上述同样的方法将杂交形成的 dsDNA 变性, 测定电化学信号, 依此循环往复直到信号发生变化为止, 通过此种方法来测定组装电极的再生性。

将组装好的电极与 dsDNA 作用一段时间后测量电化学信号, 然后将此电极放入 4°C 的环境中保存, 每过一段时间测量一次电信号, 直到信号发生变化为止, 以此来测量该组装电极的稳定性。

3.2.6 离子强度对 dsDNA 与 Au-MBT 自组装电极相互作用的影响

以组装好的金电极为工作电极, SCE 为参比电极, 铂丝电极为辅助电极, 在 $0.04 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{pH} = 7.00$ 的 BR 和 dsDNA 溶液中, 加入不同浓度的氯化钠溶液, 然后采用微分脉冲伏安法 (DPV) 检测, 微分脉冲的条件: 初始电位为 $+1.0 \text{ V}$, 终止电位为 0 V , 间隔时间为 2 s 。随着氯化钠溶液浓度的增加, 得到一系列 DPV 曲线。

3.3 结果与讨论

3.3.1 MBT 组装金电极的表面特征

图 3-1 为裸金电极(a)和 MBT 组装金电极(b)的扫描电镜图, 从图中可以看出,

裸金电极表面比较光滑(图 3-1, a), 而 MBT 组装金电极表面有一层致密的 MBT 单分子层(图 3-1, b)。由此可以推断, 通过将裸金电极浸入 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的乙醇溶液中 36 h 的自组装方法是可行的。

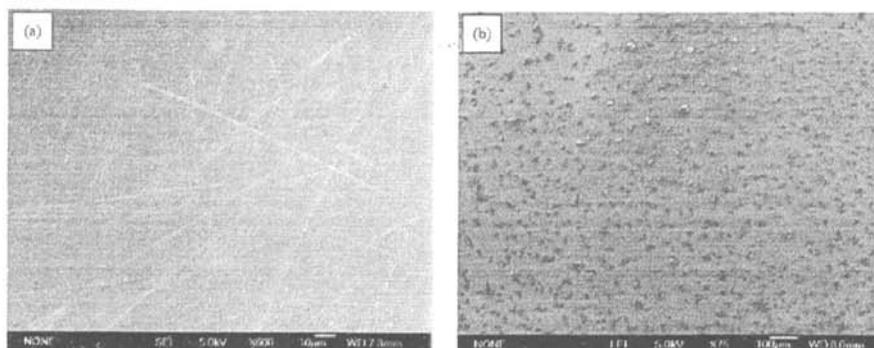


图 3-1 裸金电极 (a) 和 MBT 修饰金电极 (b) 的扫描电镜图

Fig. 3-1 The SEM images of electrodes: (a) the planar gold electrode; (b) the MBT modified gold electrodes obtained by immersing the bare gold electrode in a $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ethanolic solution of MBT for 36 h.

3.3.2 MBT 组装电极的电化学行为

巯基类的或含硫类的化合物可以自发的吸附到金电极表面形成自组装单分子膜, 过去关于脂肪族类的巯基化合物在金电极表面形成自组装膜的报道很多, 但是现在芳香类巯基化合物已经引起人们极大的兴趣。MBT 是一种噻唑类衍生物, 苯环和噻唑环紧密相联并且通过噻唑环上的巯基与电极形成自组装膜。MBT 以硫代和硫醇两种形式存在, Sandhyarani 等人^[26]报道说 MBT 以硫代的形式吸附到金电极表面, 如示意图 3-1。

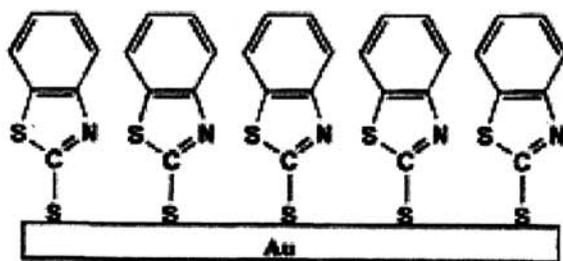


示意图 3-1 MBT 在金电极表面形成的自组装膜的结构图

Scheme 3-1 Formation of the self-assembled monolayer of MBT on gold.

图 3-2 中介绍了裸金电极和 MBT 自组装金电极在 BR 缓冲溶液中的循环伏安行为, 从图中可以明显的观察到, MBT 组装金电极的峰电流明显低于裸金电极的峰电流。此现象可以说明, MBT 已经在金电极表面形成单层膜并且此单层膜可以有效的阻碍电子转移。这个结果与已经报道过的现象吻合^[20]。

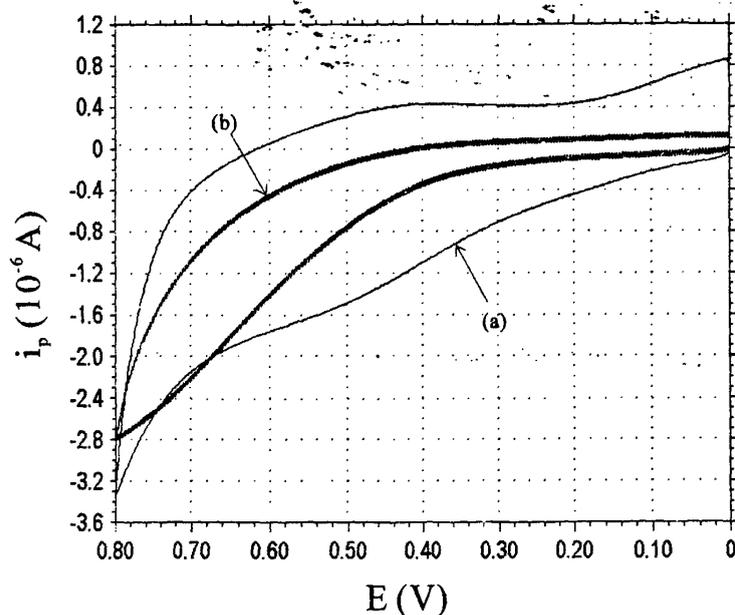


图 3-2 裸金电极 (a) 和组装电极 (b) 在 BR 缓冲溶液中的循环伏安曲线

Fig. 3-2 Cyclic voltammograms of the bare (a) and the modified gold electrode (b) in $0.04 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BR buffer solution at pH 7.00.

通过铁氰化钾的氧化还原电对作为探针进一步证明了 MBT 在金电极表面形成了自组装膜。分别将 Au 电极和 Au-MBT 电极浸入 $0.04 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BR 缓冲溶液 (pH = 7.00) 和 $5 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 的混合溶液中, 检测电化学信号。结果如图 3-3 所示, 从图中可以发现, 裸金电极在溶液中有有一对可逆的 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 电对的氧化还原峰而组装电极几乎没有峰。这一现象进一步证明了 MBT 在金电极表面形成了自组装单层膜并且有效阻止了电极表面的电子转移。据报道, MBT 在中性介质中以 MBT 的形式存在^[10]。因为 MBT 带负电荷与铁氰化钾的负电对相排斥, 所以 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 电对不易在电极表面进行氧化还原, 因此 Au-MBT 电极在铁氰化钾溶液中几乎没有峰电流。

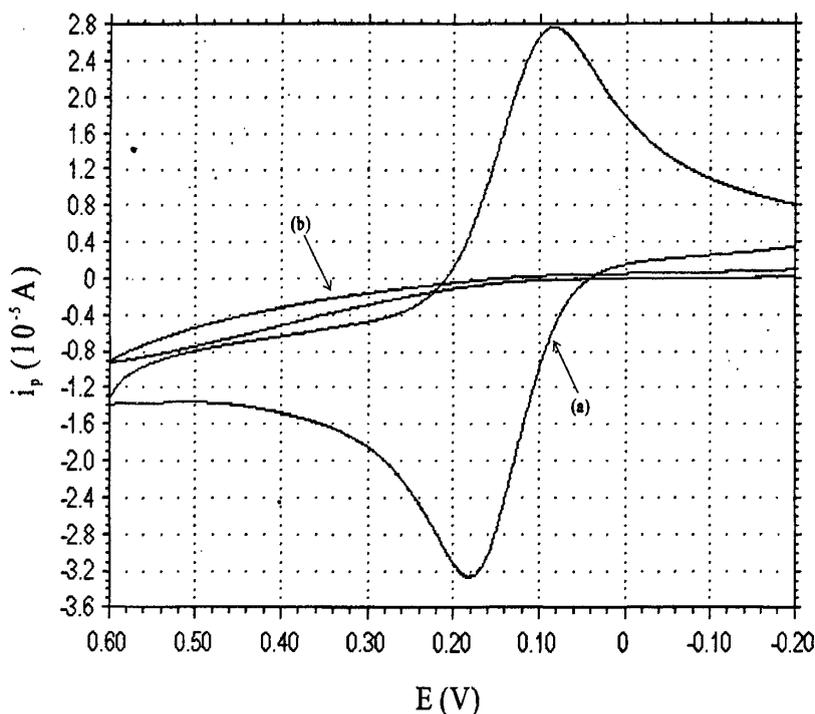


图 3-3 裸金电极 (a) 和组装电极 (b) 在 BR 与 $K_3Fe(CN)_6$ 混合溶液中的循环伏安曲线

Fig. 3-3 Cyclic voltammograms of the bare (a) and the modified gold electrode (b) in $0.04 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BR buffer solution (pH 7.00) containing $5 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} K_3Fe(CN)_6$.

3.3.3 Au-MBT 电极与 dsDNA 的相互作用

虽然组装电极在 BR 缓冲溶液中 (pH=7.00) 的循环伏安图没有明显的氧化还原峰 (图 3-2), 但是它在 BR 缓冲溶液中的微分脉冲图却能够观察到一个明显的还原峰, 如图 3-4 所示, 裸金电极在 BR 缓冲溶液中的还原峰 (图 3-4 A) 比组装电极的峰大很多 (图 3-4 B) 我们发现组装金电极的峰电位与裸金电极的峰电位相比几乎完全相同, 说明在裸金电极和修饰电极上发生的是相同的氧化还原过程。

裸金电极在空白的 BR 缓冲溶液中峰电流最大, 随着 dsDNA 浓度的增加, 裸金电极的峰电流逐渐降低, 这可能是因为 dsDNA 吸附到裸金电极表面阻碍了电子转移, 然而, 这种随着 dsDNA 浓度增加峰电流降低的现象是没有线性关系的, 也就是说这种吸附作用是没有规律的。

组装电极在 BR 缓冲溶液中 (pH=7.00) 的峰电流比裸金电极的峰电流有明显的降低, 这种现象也表明 MBT 在金电极表面形成了单层膜, 因此大大阻止了金电极表面的电子转移。然而, 与裸金电极不同的是, 随着 dsDNA 浓度的增加峰电流也逐渐增加并且符合线性规律 (图 3-4 B)。Wang 等人^[12]研究了巯基剂组装金电极与

dsDNA相互作用的电化学行为。他们认为，巯基是含有巯基的平面分子，它可以在金电极表面形成Au-S键，平面的巯基分子可以嵌插入dsDNA的小沟中形成电子转移通道。而且，此种嵌插加速了金的电子转移速率。换句话说，dsDNA成为了远程电子转移的媒介并且形成了DNA-媒介电子转移的结构。Whelan 等人^[27]报道说MBT分子平面垂直结合于金电极表面。因此，MBT和巯基剂一样也形成了DNA-媒介电子转移的结构。长程的电子转移仅仅发生在双螺旋结构当中，当MBT嵌插入dsDNA后才能形成长程电子转移通道，因此，Au-MBT可以选择性的区分dsDNA和ssDNA。

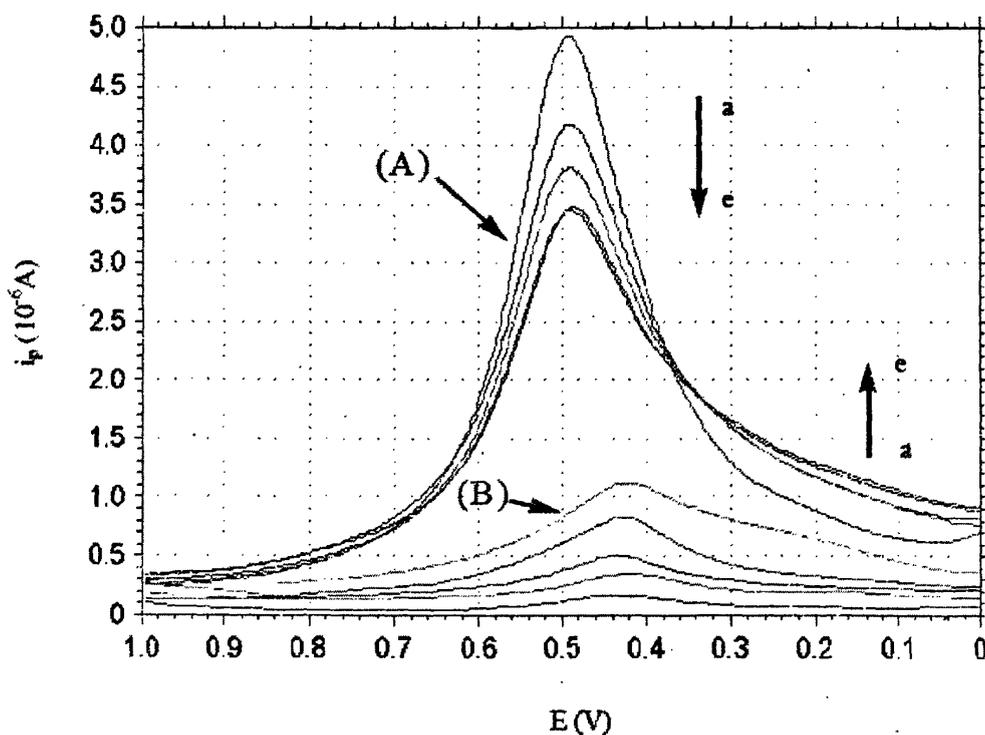


图3-4 裸金电极和组装电极在不同浓度的dsDNA 溶液中的微分脉冲曲线

Fig. 3-4 The reductive peaks of gold on bare (A) and MBT modified Au electrode (B) at different salmon sperm dsDNA concentrations: (a) 0; (b) 6.67×10^{-4} ; (c) 1.67×10^{-3} ; (d) 3.33×10^{-3} ; (e) $5.00 \times 10^{-3} \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

3.3.4 离子强度对 Au-MBT 电极与 dsDNA 的相互作用的影响

当溶液中离子强度增加时，溶液中阳离子所带正电会和 dsDNA 的磷酸骨架

所带负电抵消, 这样就会减小 dsDNA 与其它物质的静电作用。因此, 与 dsDNA 静电结合的物质峰电流就会减少而对与 dsDNA 嵌插结合的物质峰电流几乎没有影响^[28]。我们在实验中检测了离子强度对 Au-MBT 电极与 dsDNA 相互作用的影响, 在含有 dsDNA 的 BR 缓冲溶液中加入不同浓度的氯化钠溶液, 当氯化钠浓度在 0.05 到 0.2 mol·L⁻¹ 的浓度范围内变化时, 组装金电极的微分脉冲电流和电位几乎没有变化。因此, 我们认为 MBT 与 dsDNA 是嵌插作用。

3.3.5 Au-MBT 电化学传感器定量检测目标 ssDNA

通过探针 DNA 与不同序列的目标 DNA 杂交检测电化学信号的方式研究了传感器的选择性。图 3-5 表示了 Au-MBT 电极在 ssDNA-A 溶液(1), ssDNA-A 和 2.24×10^{-6} mol·L⁻¹ ssDNA-B 的混合溶液 (2), ssDNA-A 和 2.24×10^{-6} mol·L⁻¹ ssDNA-C 的混合溶液 (3), ssDNA-A 和 2.24×10^{-6} mol·L⁻¹ ssDNA-D 的混合溶液 (4), 1.81×10^{-6} mol·L⁻¹ 鲑鱼精 ssDNA 溶液(5), 1.81×10^{-6} mol·L⁻¹ 鲑鱼精 dsDNA 溶液(6)中的微分脉冲信号。在图中可以看出, 只有探针 ssDNA-A 时几乎没有峰电流信号, 但是当探针与完全互补链的 ssDNA-B 杂交以后, 因为 MBT 嵌插进了杂交形成的 dsDNA 双螺旋结构中, 所以峰电流明显增大。探针与三个碱基非互补的 ssDNA-C 和一个碱基非互补的 ssDNA-D 杂交以后, 峰电流信号与杂交以前相比几乎没有变化, 证明此电极具有很高的选择性。从图中不仅可以看出 21 个碱基的 ssDNA 和 dsDNA 有明显不同的电流信号, 也可以发现长链的鲑鱼精 ssDNA 和 dsDNA 也有明显不同的电流信号, 以此可以得出结论 Au-MBT 电极不仅可以选择性的检测 21 个碱基的 DNA 同时也可以检测长链的 DNA。

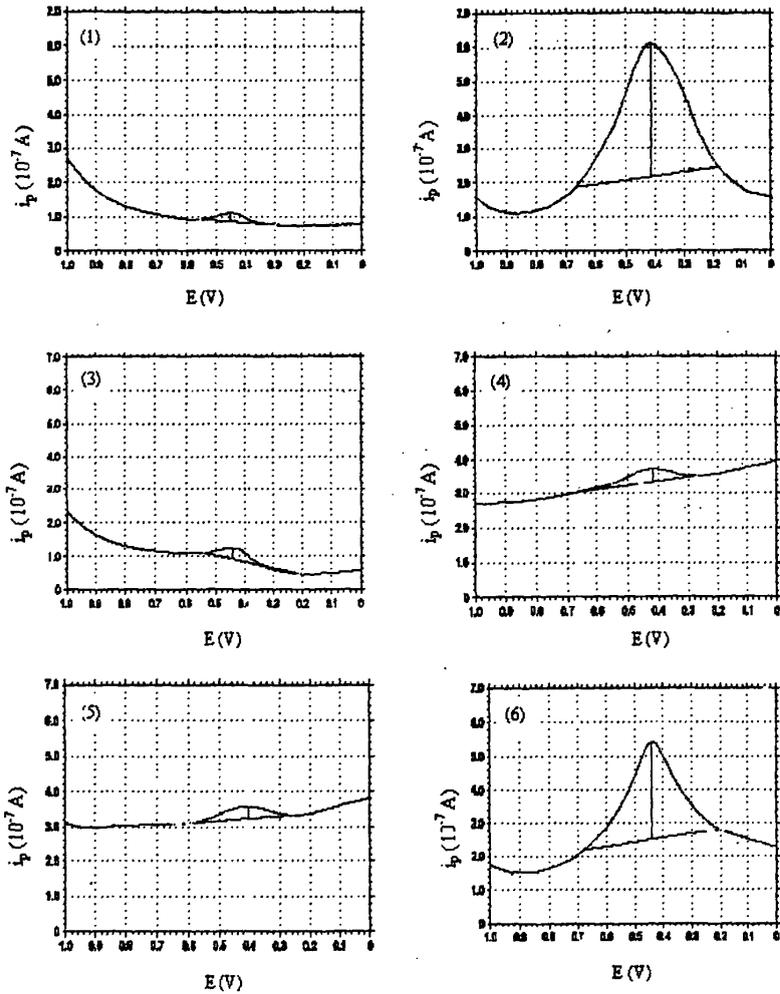


图 3-5 组装电极在不同的 DNA 溶液中的微分脉冲曲线

Fig. 3-5 The differential pulse voltammograms on MBT modified Au electrode in the solution of ssDNA-A (1), ssDNA-A plus $2.24 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ssDNA-B (2), ssDNA-A plus $2.24 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ssDNA-C (3), ssDNA-A plus $2.24 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ssDNA-D (4), $1.81 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Salmon sperm ssDNA (5), and $1.81 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Salmon sperm dsDNA (6). The concentration of ssDNA-A was all controlled at $3.00 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

我们通过改变目标 ssDNA 的浓度研究了峰电流信号的变化与目标 ssDNA 浓度的关系，峰电流信号表明了探针 ssDNA 与目标 ssDNA 的杂交程度。从图 3-6 中可以看出，还原峰电流的增加（与空白相比）值与目标 ssDNA 的浓度在 1.59×10^{-8} 到 $2.40 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内呈线性关系，相关系数为

0.9987, 线性方程为 $\Delta i_{pc} = 0.1634C + 2.6062 \times 10^{-8}(C, \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}; \Delta i_{pc}, \text{A})$, ($3\sigma, n = 11$)。

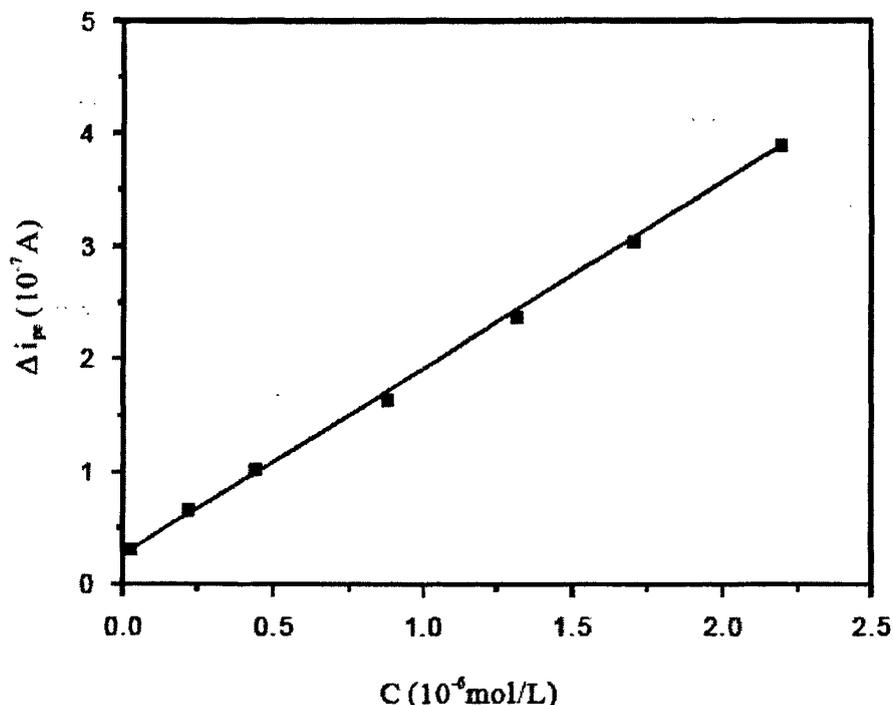


图 3-6 目标 ssDNA-B 的浓度与组装电极的峰电流增加值的线性关系曲线

Fig. 3-6 The concentration of target ssDNA-B vs the increase of cathodic peak current Δi_{pc} on MBT modified Au electrode (the concentration of probe ssDNA is $3.00 \times 10^{-6} \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$).

3.3.6 Au-MBT 电化学传感器的重现性和再生性

按相同方法同时组装三个 Au-MBT 电极, 依次记为 Au-MBT-1, Au-MBT-2 Au-MBT-3. 分别将三个电极放入相同浓度的 ssDNA-A 和 ssDNA-B 的混合溶液中, 按上述步骤进行杂交, 然后分别检测三个电极的电化学信号。检测结果的峰电流和峰电位值列入了表 3-1 中, 从检测结果可以得出结论, 这三个电极的峰电流和峰电位几乎没有变化, 表明此种新型的传感器具有非常好的重现性。

表 3-1 三根组装电极在 $3.00 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ssDNA-A 与 $1.34 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ssDNA-B 杂交溶液中的微分脉冲信号值

Table 3-1 Responses of three Au-MBT electrodes after DNA hybridization in the mixture of $3.00 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ssDNA-A plus $1.34 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ssDNA-B

	Peak current (10^{-7} A)	Peak potential (V)
Au-MBT-1	2.853	0.436
Au-MBT-2	2.846	0.436
Au-MBT-3	2.857	0.435

我们通过不断解掉杂交形成的 dsDNA 的双螺旋然后再杂交再解旋的方法来检测 Au-MBT 电化学传感器的再生性，在十次检测/再生的循环过程中，峰电流信号没有明显的变化，因此，此种电化学传感器可以反复多次用来检测目标 ssDNA。

3.3.7 Au-MBT 电化学传感器的稳定性

将制备好的 Au-MBT 电化学传感器放入 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的环境下保存，然后每隔一段时间测定一次电化学信号，在一周之内，Au-MBT 电化学传感器具有很好的稳定性。第七天，峰电流信号降低到第一次测量的 97.8%，一周以后，峰电流明显下降。

3.4 本章小结

在本章中通过自组装的方法制备了 Au-MBT 电极，并且通过扫描电镜和电化学的方法对这种组装行为进行了表征，发现在金电极表面自组装形成了一层 MBT 膜，接着考察了此种组装电极和 dsDNA 的相互作用。发现随着 dsDNA 浓度的增加组装电极的还原峰电流也逐渐的增加，并且在一定范围内呈线性关系。峰电位和裸金电极的相比几乎没有变化，表明在裸金电极和组装电极表面发生了同样的电化学反应。

同样考察了此种组装电极和 ssDNA 的相互作用，没有发生峰电流的改变，表明此电极可以用来制备传感器选择性的识别 dsDNA 和 ssDNA。并且该传感器可以用来定量的检测目标 ssDNA，峰电流信号的不同表明了探针 ssDNA 与目标 ssDNA 杂交程度的不同，微分脉冲曲线的还原峰电流的增加值与目标 ssDNA 的浓度在一定范围内呈线性关系。因为 Au-MBT 具有很高的灵敏性，并且制备简便，价格低

廉，稳定性好，可以重复利用等特点，因此此种传感器可以用来连续定量的检测生物样品中的ssDNA。

参考文献

- [1] Cubeddu L., White M. F., DNA damage detection by an archaeal single-stranded DNA-binding protein[J], *J. Mol. Biol.*, 2005, 353: 507–516
- [2] Liang M., Guo L.H., Photoelectrochemical DNA sensor for the rapid detection of DNA damage induced by styrene oxide and the fenton reaction[J], *Environ. Sci. Technol.*, 2007, 41: 658–664
- [3] Riccardi C.S., Yamanaka H., Josowicz M., et al, Label-Free DNA Detection Based on Modified Conducting Polypyrrole Films at Microelectrodes[J], *Anal. Chem.*, 2006, 78: 1139–1145
- [4] Bunimovich Y.L., Shin Y.S., Yeo W.S., et al, Quantitative Real-Time Measurements of DNA Hybridization with Alkylated Nonoxidized Silicon Nanowires in Electrolyte Solution[J], *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128: 16323–16331
- [5] Yang N., Su X.D., Tjong V., et al, Evaluation of two- and three-dimensional streptavidin binding platforms for surface plasmon resonance spectroscopy studies of DNA hybridization and protein–DNA binding[J], *Biosens. Bioelectron.*, 2007, 22(11): 2700–2706
- [6] Mullet W.M., Lai E.P.C., Yeung J.M., Surface plasmon Resonance–Based Immunoassays[J], *Methods*, 2000, 22: 77–91
- [7] Su X., Lin C.Y., O'Shea S.J., et al, Combinational Application of Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Quartz Crystal Microbalance for Studying Nuclear Hormone Receptor-Response Element Interactions[J], *Anal. Chem.*, 2006, 78: 5552–5558
- [8] Picard C., Davoust L., Resonance Frequencies of Meniscus Waves as a Physical Mechanism for a DNA Biosensor[J], *Langmuir*, 2007, 23(3): 1394–1402
- [9] Takahashi S., Matsuno H., Furusawa H., et al, Kinetic analyses of divalent cation-dependent EcoRV digestions on a DNA-immobilized quartz crystal microbalance[J], *Analytical Biochemistry*, 2007, 361(2): 210–217
- [10] Vergheese T.M., Berchmans S., Bio-inspired recognition of dopamine versus ascorbic acid[J], *J. Electroanal. Chem.* 2004, 570: 35–46
- [11] Ye Y., Ju H., Rapid detection of ssDNA and RNA using multi-walled carbon nanotubes modified screen-printed carbon electrode[J], *Biosens. Bioelectron.*, 2005, 21: 735–741
- [12] Wang S.F., Wang W., Cai H.C., Recognition and detection of dsDNA at a thionialid self-assembled monolayer modified gold electrode[J], *Sensor Actuat. B-Chem*, 2005, 104: 8–14
- [13] Ashtari P., He X., Wang K., et al, An efficient method for recovery of target ssDNA based on

- amino-modified silica-coated magnetic nanoparticles[J], *Talanta*, 2005, 67: 548–554
- [14] Turcu F., Schulte A., Hartwich G., et al, Imaging immobilised ssDNA and detecting DNA hybridisation by means of the repelling mode of scanning electrochemical microscopy (SECM) [J], *Biosens. Bioelectron.*, 2004, 20: 925–932
- [15] Profumo A., Merli D., Pesavento M., Self-assembled monolayer modified gold electrodes for traces Cu(II) determination[J], *Anal. Chim. Acta*, 2006, 557: 45–51
- [16] Tan Y.S., Srinivasan M.P., Pehkonen S.O., Self-assembled organic thin films on electroplated copper for prevention of corrosion[J], *J. Vac. Sci. Technol. A*, 2004, 22: 1917–1925
- [17] Sandhyarani N., Pradeep T., 2-Mercaptobenzothiazole protected Au and Ag clusters[J], *J. Mater. Chem.*, 2000, 10: 981–986
- [18] Tan Y., Jiang L., Li Y., et al, One dimensional aggregates of silver nanoparticles induced by the stabilizer 2-mercaptobenzimidazole[J], *J. Phys. Chem. B.*, 2002, 106: 3131–3138
- [19] Berchmans S., Yegnaman V., Rao G.P., Self-assembled monolayers on electrode surfaces: a probe for redox kinetics[J], *J. Solid State Electr.*, 1998, 3: 52–54
- [20] Jun Y.Y., Beng K.S., Electrochemical study of monolayers of heterocyclic thiols self-assembled on polycrystalline gold electrode: the effect of solution pH on redox kinetics[J], *Electrochem. Commun.*, 2004, 6: 87–90
- [21] Shervedani R., Babadi M.K., Application of 2-mercaptobenzothiazole self-assembled monolayer on polycrystalline gold electrode as a nanosensor for determination of Ag(I)[J], *Talanta*, 2006, 69: 741–746
- [22] Wan Q., Yang N., The direct electrochemistry of folic acid at a 2-mercaptobenzothiazole self-assembled gold electrode[J], *J. Electroanal. Chem.*, 2002, 527: 131–136
- [23] Wang J., Zeng B.H., Fang C., et al, Electrochemical characteristic of 2-mercaptobenzothiazole self-assembled monolayer on gold[J], *Anal. Sci.*, 2000, 16: 457–461
- [24] Steichen M., Buess-Herman C., Electrochemical detection of the immobilization and hybridization of unlabeled linear and hairpin DNA on gold[J], *Electrochem. Commun.*, 2005, 7: 416–420
- [25] Wang R., Tombelli S., Minunni M., et al, Immobilisation of DNA probes for the development of SPR-based sensing[J], *Biosens. Bioelectron.*, 2004, 20: 967–974
- [26] Sandhyarani N., Skanth G., Berchmans S., et al, A combined surface-enhanced Raman-X-ray photoelectron spectroscopic study of 2-mercaptobenzothiazole monolayers on polycrystalline Au and Ag films[J], *J. Colloid Interf. Sci.*, 1999, 209: 154–161
- [27] Whelan C.M., Smyth M.R., Barnes C.J., The influence of heterocyclic thiols on the electrodeposition of Cu on Au(111)[J], *J. Electroanal. Chem.*, 1998, 441: 109–129

- [28] Pozo M.V. del, Alonso C., Pariente F., et al, DNA biosensor for detection of helicobacter pylori using phen-dione as the electrochemically active ligand in osmium complexes[J], Anal. Chem., 2005, 77: 2550–2557

第四章 二巯基苯并咪唑自组装金电极检测和 识别ssDNA的电化学研究

4.1 引言

本章中使用的二巯基苯并咪唑 (MBI) 与第三章中的MBT一样都是杂环类巯基化合物, 都具有在金电极表面形成稳定的自组装膜的特点。所以, 本章用第三章同样的方法研究了MBI组装的金电极作为工作电极制备的DNA电化学传感器。同时我们又在第三章的基础上对实验进行了优化。

上章中因为电极表面已经固定了MBT, 所以无法在电极表面固定探针DNA, 因此只能在溶液中引入探针和目标DNA使二者杂交, 这样不利于实际样品的测量。在本章中, 我们引入了玻碳电极, 首先在玻碳电极表面固定探针DNA, 然后通过杂交的方法使样品中的目标DNA选择性的识别出来, 脱离样品基体。接着将形成了dsDNA的玻碳电极在新的溶液中变性, 使目标DNA进入新的溶液中, 在此溶液中加入足量的探针DNA, 在合适的条件下, 使两种DNA杂交, 用MBI组装电极进行检测, 提高了选择性。具体的步骤如示意图4-1。和第三章一样, 考察了离子强度对组装电极与dsDNA相互作用的影响, 发现MBI与dsDNA发生了嵌插结合作用。同时, 峰电流信号与dsDNA浓度在一定范围内呈线性关系且信号不随ssDNA浓度的变化而变化, 表明了此种电极具有识别dsDNA和ssDNA的能力。

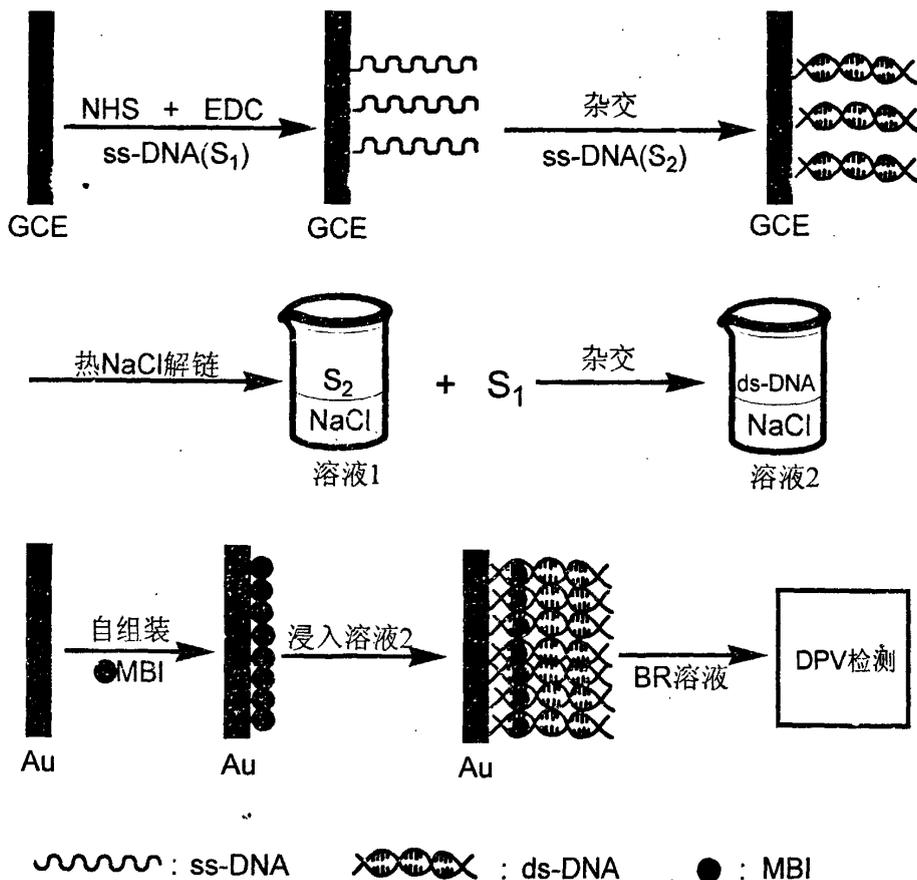


示意图4-1 实验设计步骤图

Scheme 4-1 The process of experiment

4.2 实验部分

4.2.1 仪器和试剂

CHI 832B 电化学分析仪 (上海辰华仪器厂); 三电极系统: 裸金电极或 MBI 修饰的金电极作为工作电极, 饱和甘汞 (SCE) 电极为参比电极, 铂丝作为辅助电极; BR (pH, 7.00) 缓冲溶液 ($0.04 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ CH}_3\text{COOH} + 0.04 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ H}_3\text{PO}_4 + 0.04 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ H}_3\text{BO}_3$) 作为支持电解质。玻碳电极用来选择目标 ssDNA-B。

MBI 购于美国 Belgium 公司, 乙基-(3-二甲基丙基)碳二亚胺盐酸(EDC, 上海源聚生物科技有限公司): $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; 羟基丁二酰亚胺(NHS, 中国医药(集团)上海化学试剂公司): $8 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; 鲑鱼精 dsDNA (10 mg mL^{-1} , $A_{260}/A_{280} > 1.8$, 上海华舜生物工程有限公司); 21 个碱基的探针 ssDNA(ssDNA-A), 目标 ssDNA

(ssDNA-B), 与探针 ssDNA 有四个碱基非互补的(ssDNA-C), 碱基序列如下:

ssDNA-A: 5'-GAG GAG TTG GGG GAG CAC ATT-3';

ssDNA-B: 5'-AAT GTG CTC CCC CAA CTC CTC-3';

ssDNA-C: 5'-AAT GTC CTC TCC CGA CTT CTC-3'.

4.2.2 制备和表征二巯基苯并咪唑组装金电极(Au-MBI)

将裸金电极在Piranha溶液(30% H₂O₂与浓H₂SO₄的混合溶液, 体积比为 3:7)中浸泡5 min, 然后依次用无水乙醇和二次蒸馏水各超声清洗1 min, 接着用0.05 μm的氧化铝抛光, 在0.1 mol·L⁻¹的硫酸溶液中循环伏安扫描, 达到稳定的扫描图形取出, 处理好的电极浸入0.1 mol·L⁻¹ MBI乙醇溶液中组装36小时形成Au-MBI自组装膜, 然后将组装好的电极在BR缓冲溶液(pH=7.00)中、0.0~0.8 V 电位范围内用100 mV·s⁻¹的速度进行循环伏安扫描以去除化学吸附的物质。用上述同样的方式依次组装三根电极。

我们通过分别记录组装前后的电极在BR缓冲溶液和BR缓冲溶液与2.5 × 10⁻⁴ mol·L⁻¹ 铁氰化钾溶液中循环伏安曲线的方法, 表征了金电极组装前后的差别。证明了此种组装方法的可行性。

4.2.3 制备和表征玻碳电极

裸玻碳电极依次用1.0 μm, 0.3 μm和0.05 μm的氧化铝粉进行抛光, 然后用蒸馏水超声, 用1 × 10⁻³ mol·L⁻¹ K₃Fe(CN)₆溶液表征电极的抛光程度。将已经抛光好的电极在50 mmol·L⁻¹, pH 7.40的磷酸缓冲溶液中恒电位(+0.50 V)氧化1 min, 然后用大量二次水冲洗电极表面。取20 μL EDC和NHS按1:1的比例混合的溶液滴于倒置的玻碳电极表面。待电极表面的混合液在红外灯下烘干后, 用二次水多次冲洗电极。然后将20 μL ssDNA-A均匀地滴于活化后的玻碳电极表面, 电极在红外灯下烘干后, 将其用二次水和Tris-HCl溶液 (pH 7.0) 冲洗片刻, 以除去吸附的DNA探针。将ssDNA-A修饰的玻碳电极同样用上述K₃Fe(CN)₆表征。

ssDNA-A修饰的玻碳电极浸入包含ssDNA-B或ssDNA-C的0.1 mol·L⁻¹ NaCl溶液中, 在 40 °C下搅拌杂交50 min, 然后将电极拿出用二次水冲洗片刻以除去吸附的ssDNA-B或ssDNA-C。将杂交以后形成的dsDNA修饰的玻碳电极也用同样的K₃Fe(CN)₆溶液表征。

4.2.4 不同 DNA 在巯基苯并咪唑修饰金电极上的电化学行为

(1) dsDNA 电化学行为: 以巯基苯并咪唑修饰的金电极为工作电极, SCE 为参比电极, 铂丝电极为辅助电极, 在 0.04 mol·L⁻¹ pH = 7.00 的 BR 溶液中采用微

分脉冲伏安法(DPV)检测, 微分脉冲的条件为: 初始电位为 1.0 V, 终止电位为 0 V, 间隔时间为 2 s, 然后向混合溶液中依次加入不同浓度的 dsDNA, 在上述条件下得到加入 dsDNA 后的微分脉冲伏安曲线。

(2) ssDNA 电化学行为: 以组装好的金电极为工作电极, SCE 为参比电极, 铂丝电极为辅助电极, 在 $0.04 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH = 7.00 的 BR 溶液中依次加入不同浓度的 ssDNA-A, 采用微分脉冲伏安法 (DPV)检测, 检测条件同上。

(3) ssDNA-A 杂交以后的电化学行为: 向从玻碳电极上解下来的含有 ssDNA-B 的 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氯化钠缓冲溶液中加入 ssDNA-A, 将巯基苯并咪唑修饰后的金电极浸入此溶液中, 在 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下搅拌反应 50 min。杂交以后的检测和 dsDNA 的检测相同。

4.2.5 检测目标ssDNA-B

将ssDNA-A修饰的玻碳电极与不同浓度的ssDNA-B杂交, 杂交以后形成的dsDNA修饰电极浸入 $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的热的 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl溶液中1 min, 然后再迅速将电极浸入冷的NaCl溶液中, 这样ssDNA-B全部被定量转入了热的和冷的NaCl溶液中, 将热的和冷的NaCl溶液混合, 向混合溶液中加入 $1.8 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ssDNA-A, 在 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下搅拌杂交50 min, 将修饰好的Au-MBI电极插入杂交好的溶液中, 通过记录微分脉冲曲线表明MBI嵌插入了杂交形成的dsDNA的碱基对中。

4.2.6 离子强度对 dsDNA 与 Au-MBI 自组装电极相互作用的影响

以组装好的金电极为工作电极, SCE 为参比电极, 铂丝电极为辅助电极, 在 $0.04 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH = 7.00 的 BR 和 dsDNA 溶液中, 加入不同浓度的氯化钠溶液, 然后采用微分脉冲伏安法 (DPV)检测, 微分脉冲的条件: 初始电位为 +1.0 V, 终止电位为 0 V, 间隔时间为 2 s。随着氯化钠溶液浓度的增加, 得到一系列 DPV 曲线。

4.3 结果与讨论

4.3.1 玻碳修饰电极的电化学表征

本实验通过 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 氧化还原电对作为探针表征了玻碳修饰电极, 因为它代表了一个简单的、电化学可逆的单电子氧化还原电对^[1], 分别用未固定 ssDNA 的裸玻碳电极, 固定了 ssDNA-A 的玻碳电极, 固定了 ssDNA-A 且与其互补 ssDNA-B 杂交了的玻碳电极和杂交完以后又变性的玻碳电极为工作电极, 于 $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 KCl 溶液中记录 $1.00 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 的循环伏安曲线,

如图 4-1 所示。从图中看到，固定了 ssDNA-A 的玻碳电极(c)和固定了 ssDNA-A 且与其互补 ssDNA-B 杂交了的玻碳电极(b)测得 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 电对的氧化还原峰电流均比裸玻碳电极(a)的明显减小。这是由于 DNA 分子带负电，固定到电极表面的 DNA 分子对带负电荷的 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 电对具有静电排斥作用，减慢了 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 在电极上的电化学反应，从而使其氧化还原峰电流均减小。比较固定了 ssDNA-A 和固定了 ssDNA-A 且与其互补 ssDNA-B 杂交了的玻碳电极，后者氧化还原电流减小的更为明显，这是由于后者经杂交后电极表面 DNA 的量更大，从而对 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 电对有更强的静电排斥作用而致。固定了 ssDNA-A(c) 和杂交完以后又变性的玻碳电极(d)几乎具有相同的 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ 氧化还原峰电流，此种现象表明变性以后的电极上只有 ssDNA-A，杂交的 ssDNA-B 全部被转移到了溶液中。

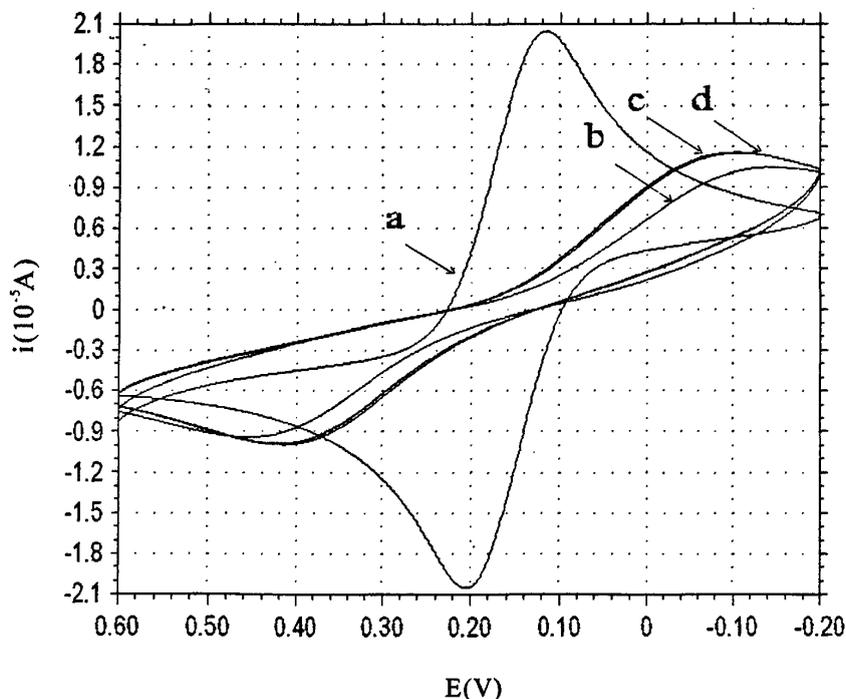


图 4-1 不同的玻碳电极在 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 溶液中的循环伏安曲线图

Fig. 4-1. The CV curves of $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ on different electrodes

- (a) Bare GCE; (b) ssDNA-A modified GCE which had been hybridized with $5.3 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ssDNA-B (c) ssDNA-A modified GCE (d) denatured modified GCE in $1.00 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$

从上图中可以得出结论,用玻碳电极可以从样品中选择性提取目标 ssDNA-B 并且可以通过解链的方式将目标 ssDNA-B 定量转移到新的溶液中。

4.3.2 Au-MBI电极的电化学表征

巯基和含硫化合物易于在金电极表面形成一种非常稳定和有序的自组装膜^[2]。MBI是一种含巯基的杂环化合物,它可以通过Au-S键稳定的结合在金电极表面。MBI自组装金电极已经应用于尿酸的检测^[3]和Hg(II)的检测^[4]。

在本文中,我们用 MBI 自组装金电极构建了一种新型的传感器。图 4-2 考察了裸金电极和 MBI 自组装金电极在缓冲溶液中的电化学行为。从图中可以看出,组装电极的峰电流明显减低,这表明 MBI 已经组装在了金电极表面并且这层组装膜有效的阻碍了电极表面的电子转移。此现象与文献报道的完全符合^[5]。为了更好的证明组装行为,我们进一步研究了两种电极在 $K_3[Fe(CN)_6]$ 溶液中的循环伏安行为。如图 4-3 所示,(a) 和 (b) 分别为裸金电极和组装电极在 $0.04 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BR (pH = 7.00) 和 $2.5 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ $K_3Fe(CN)_6$ 混合溶液中的循环伏安曲线。从图中可以看出,裸金电极在 $K_3[Fe(CN)_6]$ 溶液中有一对可逆的氧化还原峰而组装电极几乎没有峰,表明组装膜抑制了 $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ 在电极表面的氧化还原。据报道,在中性溶液中,MBI 以硫醇盐的形式存在^[6],提供负电荷,此种负电荷与 $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ 相互排斥,因此阻止了 $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ 在电极表面的氧化还原,使峰电流明显降低。

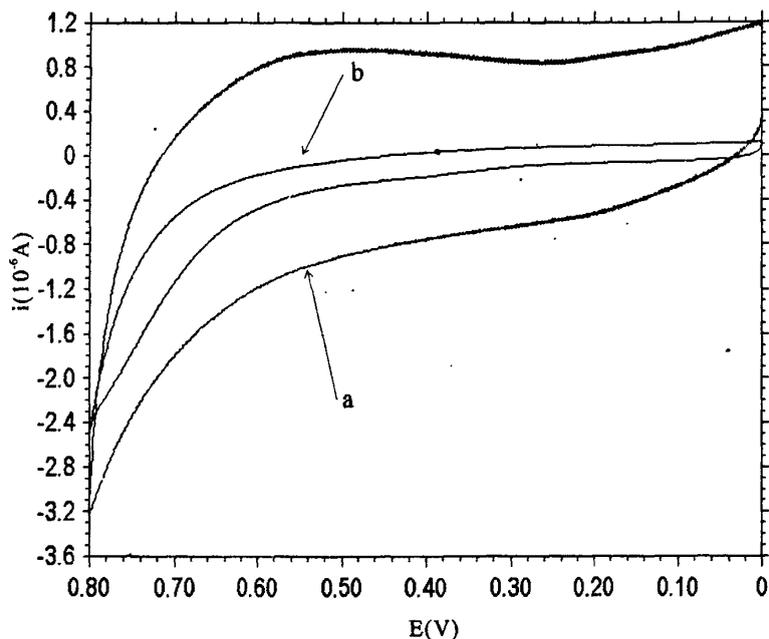


图 4-2 裸金电极 (a) 和组装电极 (b) 在 BR 缓冲溶液中的循环伏安曲线

Fig. 4-2 Cyclic voltammograms of the bare (a) and the modified gold electrode (b) in $0.04 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BR buffer solution at pH 7.00.

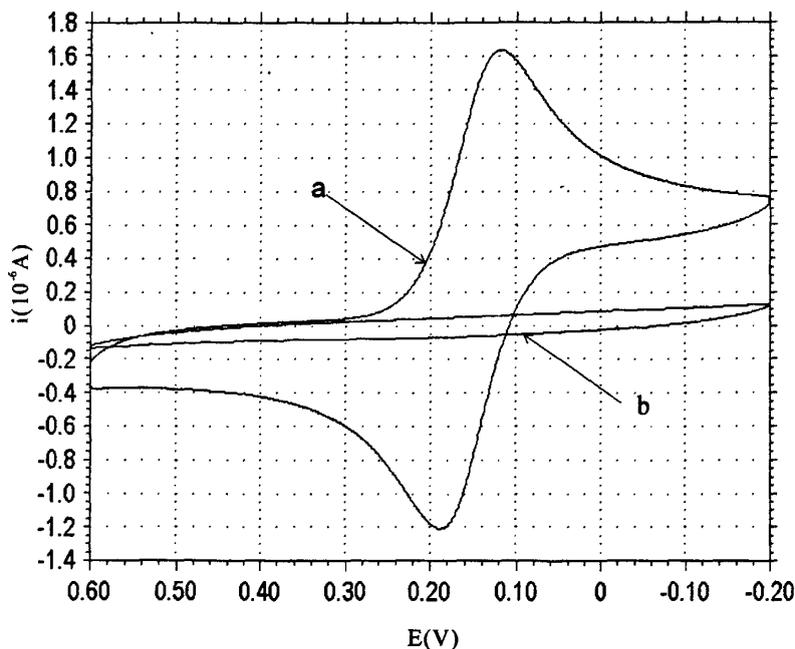
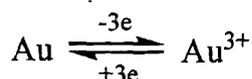


图 4-3 裸金电极 (a) 和组装电极 (b) 在 BR 与 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 混合溶液中的循环伏安曲线

Fig. 4-3 Cyclic voltammograms of the bare (a) and the modified gold electrode (b) in $0.04 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BR buffer solution (pH 7.00) containing $2.5 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$

4.3.3 dsDNA与Au-MBI 相互作用的电化学行为

图 4-4 中 A 部分是裸金电极在不同浓度的 dsDNA 溶液中的 DPV 曲线, B 部分是 Au-MBI 电极在不同浓度的 dsDNA 溶液中的 DPV 曲线。A 部分中的最高峰是由裸金电极在 dsDNA 的浓度为零的 pH = 7.00 的 BR 缓冲溶液中产生的峰, 并且这个峰的出峰电位与图 4-4 中 B 部分峰的出峰电位基本相同, 这说明在裸金电极表面和巯基苯并咪唑自组装金电极表面发生的是同一种氧化还原过程, 我们推测为:



我们将 Au-MBI 电极产生的还原峰与裸金电极产生的还原峰进行比较, 发现 Au-MBI 电极产生的还原峰远远低于裸金电极产生的还原峰, 这更进一步证明了巯基苯并咪唑已经组装在了金电极表面, 并且证明自组装金电极表面的巯基苯并咪唑单分子层阻碍了金电极表面的电子转移。

在同样的实验条件下, 裸金电极表面的还原峰随着 dsDNA 浓度的增加而减小。此结果表明 dsDNA 本身不能够加速电子的转移速率, 相反由于金电极表面吸附了 dsDNA 而阻碍了电子的转移, 但是这种吸附是非特异性的, 峰电流值的减小与 dsDNA 浓度的增加在一个宽的浓度范围内是不呈线性的。与此相反, 在不存在 dsDNA 的情况下, 用组装电极测的峰电流最小, 随着 dsDNA 浓度的增加, 峰电流逐渐增加, 并且增加值与 dsDNA 浓度呈线性关系。我们认为, MBI 中的平面芳香基团嵌插入了 dsDNA 的小沟中, 使 dsDNA 作为一种电子转移的通道引起峰电流的增加。dsDNA 浓度越大, 电子转移的通道越多, 峰电流越大。

由于上述原因, 裸金电极不适合用来检测 dsDNA 的浓度。Au-MBI 电极的空白值非常低并且它的还原峰电流随着 dsDNA 浓度的增加呈有规律的增大, 所以 Au-MBI 电极适合用来检测 dsDNA 的浓度。

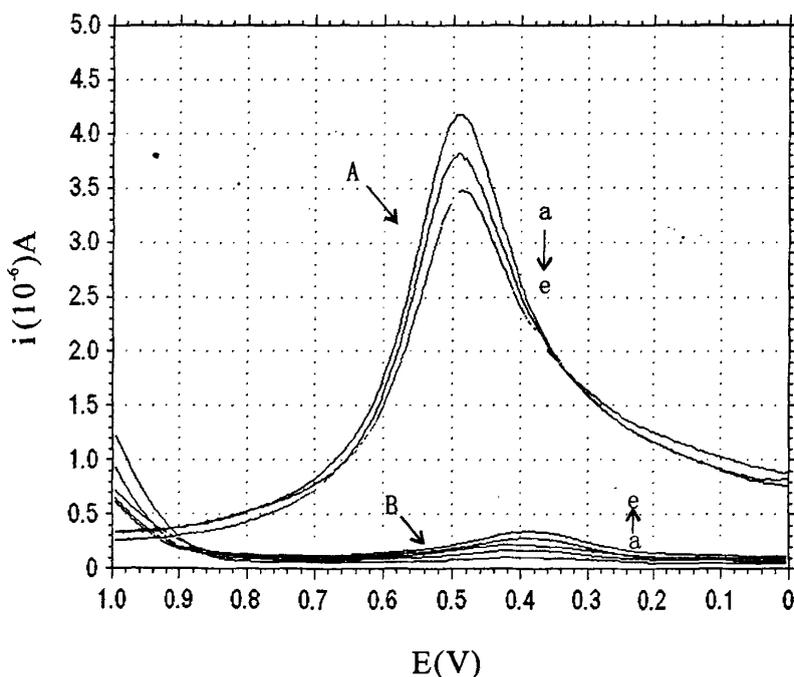


图4-4 裸金电极和组装电极在不同浓度的dsDNA 溶液中的微分脉冲曲线

Fig. 4-4 The reductive peaks of gold on bare (A) and MBI modified Au electrode (B) at different salmon sperm dsDNA concentrations:

(a) 0; (b) 6.67×10^{-4} ; (c) 1.67×10^{-3} ; (d) 3.33×10^{-3} ; (e) $5.00 \times 10^{-3} \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

4.3.4 裸金电极和自组装金电极与 ssDNA 相互作用的电化学行为

在上述相同的实验条件下我们做了裸金电极和 Au-MBI 电极与 ssDNA 浓度关系的实验。在不存在 ssDNA 的空白缓冲溶液中，裸金电极的峰电流最大，组装电极峰电流很小，这是因为组装膜阻碍了电子转移。随着 ssDNA 浓度的增大，用 Au-MBI 电极检测的还原峰电流基本没有发生变化，这是因为 ssDNA 的单链结构不能形成电子转移通道，所以不能加速电子转移；同时 ssDNA 的吸附作用减弱电子转移的效力与自组装膜的减弱效应相比可以忽略，所以 ssDNA 也几乎没有降低电子转移的能力。

但是随着 ssDNA 浓度的增大，用裸金电极检测的还原峰电流逐渐减小，而峰电位几乎没有变化，这是因为 ssDNA 与 dsDNA 一样也能够吸附在金电极表面，但是这种吸附是非特异性的，因此裸金电极峰电流值的减小是没有规律性的。

Au-MBI 电极在含有 ssDNA-A 或 ssDNA-B 的 pH = 7.00 的 BR 缓冲溶液都没有微分脉冲伏安还原峰电流的变化。但是当在 pH = 7.00 的 BR 缓冲溶液加

入杂交以后形成的 dsDNA 就有还原峰的升高现象，并且峰电流值的变化和目标 ssDNA 浓度在一定范围内呈线性关系。这些证明 dsDNA 和 ssDNA 在自组装电极表面具有不同的电化学性质。所以说明 Au-MBI 电极可以用于 dsDNA 的检测，还可以用于对杂交 ssDNA 的检测。

4.3.5 离子强度对 dsDNA 与 Au-MBI 相互作用的影响

我们研究了离子强度对 dsDNA 与 Au-MBI 相互作用的影响。当溶液中离子强度增加时，溶液中的阳离子所带的正电荷与核酸上的磷酸骨架带的负电荷相互抵消，如果 dsDNA 与 Au-MBI 之间是静电作用，那么随着离子强度的增加，峰电流会逐渐降低。如果是嵌插作用，峰电流就不会有变化^[7]。在本实验中，随着 NaCl 浓度的增加，DPV 信号基本没有变化。从而证明 dsDNA 与 Au-MBI 之间是嵌插作用。

4.3.6 Au-MBI 电化学传感器定量检测目标 ssDNA

我们用 Au-MBI 电极构建了一种新型的电化学传感器，并且用它定量的检测了目标 ssDNA-B。前一章我们用 Au-MBT 电极检测了目标 DNA，正如本章引言中所说，由于 Au-MBT 电极在实际样品测定中的局限性，我们改变生产工艺，用一种新的方法检测了目标 ssDNA，具体步骤见示意图 4-1。

由于探针和目标 DNA 杂交以后形成了双链结构，所以杂交以后峰电流升高并且目标 DNA 浓度越大峰电流升高得越多，峰电流的增加值表明了杂交的程度。如果目标 DNA 和探针不互补就不能形成双链结构，峰电流就不会增加，以此来证明此种传感器的选择性。图 4-5 中给出了 Au-MBI 电极在不同溶液中的 DPV 曲线，(1) 为探针 ssDNA-A 溶液 (2) 为 ssDNA-A 与 $2.24 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 互补 ssDNA-B 的杂交溶液 (3) 为 ssDNA-A 与 $2.24 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 非互补 ssDNA-C 的杂交溶液 (4) 为 ssDNA-A 与 $2.65 \times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 互补 ssDNA-B 的杂交溶液。从图中可以看出，在探针 ssDNA-A 溶液中几乎没有峰，这是因为 ssDNA 不能和 MBI 发生嵌插作用，因此也不能形成电子转移通道。在 ssDNA-A 与非互补 ssDNA-C 的杂交溶液中具有和探针 ssDNA-A 溶液中相同的现象，这是因为 ssDNA-A 与 ssDNA-C 非互补不能杂交形成双链结构。相反，在 (2) 和 (4) 图中峰电流明显增加，这是因为杂交以后形成了双螺旋结构。并且比较 (2) 和 (4) 图发现 ssDNA-B 浓度越大峰电流越大。基于这种现象考察了 ssDNA-B 浓度与峰电流变化的关系，如图 4-6 所示，ssDNA-B 浓度在 1.32×10^{-8} 和 $1.59 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度范围内，峰电流的增加值与 DNA 浓度呈线性关系，相关系数为 0.9922，检测限为 $4.58 \times 10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

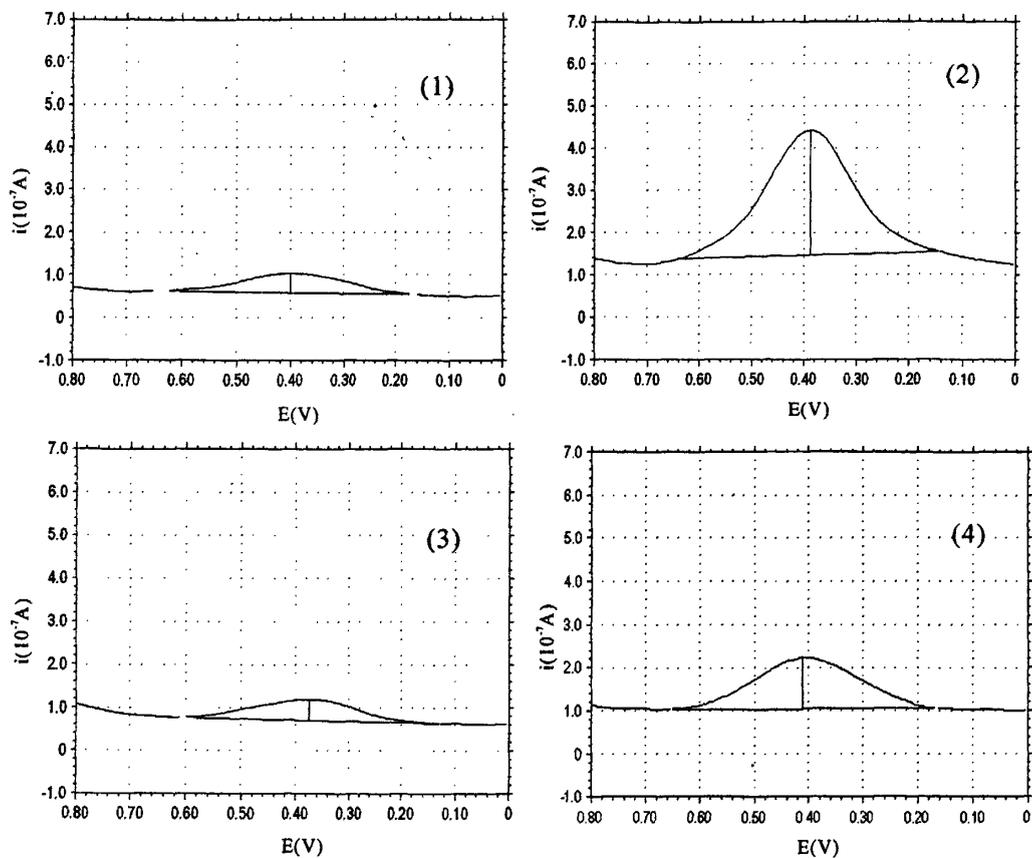


图 4-5 组装电极在不同的 DNA 溶液中的微分脉冲曲线

Fig. 4-5 The differential pulse voltammograms on MBI modified Au electrode in the solution of ssDNA-A (1), ssDNA-A plus $1.06 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ssDNA-B (2), ssDNA-A plus $1.06 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ssDNA-C (3) ssDNA-A plus $2.65 \times 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ssDNA-B (4)

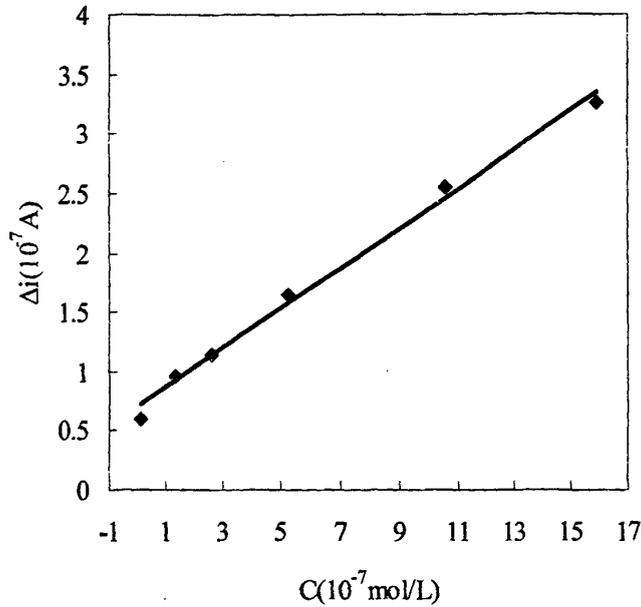


图4-6目标ssDNA-B的浓度与组装电极的峰电流增加值的线性关系曲线

Fig. 4-6 The concentration of target ssDNA vs the increase of cathodic peak current Δi on MBI modified Au electrode (the concentration of probe ssDNA is $1.8 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$)

4.4 本章小结

受第三章的启发,在本章中通过自组装的方法制备了Au-MBI电极,并且通过电化学的方法对这种组装行为进行了表征,发现在金电极表面自组装形成了一层MBI膜,接着考察了此种组装电极和dsDNA的相互作用。发现随着dsDNA浓度的增加组装电极的还原峰电流也逐渐的增加,并且在一定范围内呈线性关系。峰电位和裸金电极的相比几乎没有变化,表明在裸金电极和组装电极表面发生了同样的电化学反应。

同样考察了此种组装电极和ssDNA的相互作用,没有发生峰电流的改变,表明此电极可以用来制备传感器选择性的识别dsDNA和ssDNA。并且该传感器可以用来定量的检测目标ssDNA,峰电流信号的不同表明了探针ssDNA与目标ssDNA杂交程度的不同,微分脉冲曲线的还原峰电流的增加值与目标ssDNA的浓度在 1.32×10^{-8} 和 $1.59 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度范围内呈线性关系。本章最大的创新点是,

通过在玻碳电极上固定探针DNA的方法选择性的提取样品中的目标DNA，然后通过变性的方法将目标DNA转移到新的溶液中，使目标与探针DNA在新溶液中杂交，然后用Au-MBI电极进行定性和定量检测，此种方法有很高的灵敏性，并且制备简便，价格低廉，稳定性好，选择性高，有望应用于实际样品的检测。

参考文献

- [1] 孙如, 葛健锋, 顾仁敖等, 以 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/5-}$ 作为探针分子研究自组装修饰电极性质, 玉林师范学院学报(自然科学), 2002, 23(3): 63-65
- [2] Profumo A., Merli D., Pesavento M., Self-assembled monolayer modified gold electrodes for traces Cu(II) determination[J], *Anal. Chim. Acta*, 2006, 557: 45-51
- [3] Raj C.R., Kitamura F., Ohsaka T., Square wave voltammetric sensing of uric acid using the self-assembly of mercaptobenzimidazole[J], *Analyst*, 2002, 127: 1155-1158
- [4] Berchmans S., Arivukkodi S., Yegnaraman V., Self-assembled monolayers of 2-mercaptobenzimidazole on gold: stripping voltammetric determination of Hg(II)[J], *Electrochem. Commun.*, 2000, 2: 226-229
- [5] Jun Y.Y., Beng K.S., Electrochemical study of monolayers of heterocyclic thiois self-assembled on polycrystalline gold electrode: the effect of solution pH on redox kinetics[J], *Electrochem. Commun.*, 2004, 6: 87-90
- [6] Doneux Th., Buess-Herman Cl., Lipkowski J., Electrochemical and FTIR characterization of the self-assembled monolayer of 2-mercaptobenzimidazole on Au(111)[J], *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2004, 564: 65-75
- [7] Pozo M.V., Alonso C., Pariente F., et al, DNA biosensor for detection of helicobacter pylori using phen-dione as the electrochemically active ligand in osmium complexes[J], *Anal. Chem.*, 2005, 77: 2550-2557

结 论

本论文分别用玻碳电极和金电极为基体发展了三种不同的DNA电化学传感器, 基于玻碳电极的传感器以镉配合物为指示剂, 通过配合物电信号的变化检测目标DNA; 基于金电极的是无指示剂的传感器。主要结论如下:

一、合成了配合物硝酸二水·双 *N*-(2-吡啶甲基)苯甲酰胺合镉(II) (简称为 $[\text{CdL}_2]^{2+}$), 通过 X-单晶衍射法测定了配合物的结构, 用电化学和荧光的方法研究了此配合物与 dsDNA 的相互作用机理。结果表明 $[\text{CdL}_2]^{2+}$ 在玻碳电极上有很好的电化学活性并且与 dsDNA 发生了嵌插结合作用。在 $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaAc-HAc (pH 7.02) 介质中, $[\text{CdL}_2]^{2+}$ 与 dsDNA 形成的复合物的结合比为 2:1, 结合常数为 $25.56 \text{ L}^{1/2}\cdot\text{mol}^{-1/2}$ 。以 $[\text{CdL}_2]^{2+}$ 为指示剂制备了一种新型检测乙肝病毒 (HBV) 的电化学传感器。将 21 个碱基序列的 HBV 单链寡核苷酸 (HBV-ssDNA) 通过共价键合作用固定到玻碳电极上, 与其互补序列单链 DNA 进行杂交, 杂交信号通过微分脉冲的方法 (DPV) 进行表征。此 DNA 传感器对目标 HBV-ssDNA 的检测线性范围为 $1.01 \times 10^{-8} \sim 1.62 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 线形相关系数为 0.9962 ($n=6$), 检测限为 $7.19 \times 10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($3\sigma, n = 11$)。

二、发展了两种新型的用 2-巯基苯并噻唑 (MBT) 和 2-巯基苯并咪唑 (MBI) 自组装金电极检测目标 ssDNA 的电化学生物传感器。因为 MBT 和 MBI 可以嵌插入 dsDNA 的双螺旋之中, 所以可以用 Au-MBT 和 Au-MBI 两种电极选择性的区分 ssDNA 和 dsDNA, 通过循环伏安的方法预先表征了 Au-MBT 和 Au-MBI 两种电极的组装情况。在含有过量的探针 ssDNA 和适量的目标 ssDNA 的杂交溶液中, 以组装电极为工作电极通过 DPV 表征了 DNA 的杂交情况。发现目标 ssDNA 的浓度与还原峰电流有一定的线性关系。利用 Au-MBT 检测时, 此传感器对目标 ssDNA 的检测范围为 $1.59 \times 10^{-8} \sim 2.4 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 检测限为 $2.38 \times 10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($3\sigma, n = 11$)。Au-MBT 电极具有很好的重现性和再生性, 在 10 次检测/再生的循环过程中, 峰电流信号没有明显的变化。利用 Au-MBI 检测时, 此传感器对目标 ssDNA 的检测范围为 $1.32 \times 10^{-8} \sim 1.59 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 检测限为 $4.58 \times 10^{-9} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。这两种传感器制备方便, 价格低廉, 在连续和定量检测实际的生物样品中目标 ssDNA 方面具有很大的发展潜力。

致 谢

本论文是在导师张书圣教授的精心指导下完成的，导师严谨求实的治学态度和对事业的执着追求精神使我深受感动，并将受益终生。

求学期间，在学习、工作和生活诸方面都得到导师的关心和帮助。在此，谨向张书圣老师表示深深的谢意。

论文完成期间李峰教授、张晓茹副教授、李雪梅副教授等老师给予了我热心的指导和帮助，在此真诚的感谢他们。

感谢鞠恒强、刘楠、顾姗姗同学及实验室其他同学的关心、帮助和支持！

最后感谢我的父母多年来在生活上和精神上给予我的无私的支持和帮助，感激之情溢于言表，我会倍加努力不辜负他们的希望！

谨向所有关心和帮助过我的老师、同学表示最真挚的感谢！

本课题承蒙国家自然科学基金资助，特致殷切谢意。

附录：攻读硕士学位期间发表的论文目录

1. Shusheng Zhang*, **Qianqian Tan**, Feng Li, Xiaoru Zhang

Hybridization biosensor using diaquabis[*N*-(2-pyridinylmethyl)benzamide- $\kappa^2 N,O$]-cadmium(II) dinitrate as a new electroactive indicator for detection of human hepatitis B virus DNA,

Sensors and Actuators B, 2007, 124: 290~296 (IF=2.331)

2. Shusheng Zhang*, **Qianqian Tan**, Xuemei Li, Feng Li

Recognition and detection of ssDNA using 2-mercaptobenzothiazole self-assembled monolayer modified gold electrode,

Sensors and Actuators B, 2008, 128: 529~535 (IF=2.331)