文章编号:1006-6144(2003)05-0494-03

DNA 浓度及序列检测的电化学传感器研究

叶永康, 鞠 先
(南京大学化学系,南京 210093)

摘 要:综述近期本课题组有关 DNA 在化学修饰电极上的电化学行为、识别和检测方面的工作。

关键词:DNA; 化学修饰电极; DNA 传感器
中图分类号:O657.15;Q523 **文献标识码**:A

生物传感器研究领域近年来已得到快速的发展。许多传感器件已成功地运用于临床化学、食品工业以及环境等诸多领域[1]。值得注意的是基于脱氧核糖核酸(DNA)的选择性和特异性反应的传感器正为疾病基因诊断、检测传染物、微小差别基因的表达度量、法庭化学、药物筛选以及环境监测勾画出美好的应用前景。DNA 生物传感器领域的发展主要集中在设计具有选择性的 DNA 杂交事件的电化学换能分子界面。

1 DNA 电化学行为与浓度检测

DNA 是绝大多数生物体的遗传物质。在生命科学中,研究 DNA 的电化学行为具有重要的意义。DNA 在汞电极上的直接电化学行为使人们对 DNA 双链的结构有了更进一步的了解[2]。然而,DNA 在固体电极上的直接电化学行为只有少数报道。我们用吸附溶出伏安法研究了热变性 DNA 在电化学预处理玻碳电极上的电化学氧化[3]。玻碳电极的电化学预处理使热变性 DNA 的检测灵敏度大大提高,电流响应增加 10 倍。热变性 DNA 的检出限为 2.0 μg/mL。作为比较,试验了同样条件下酸变性 DNA(用 $HClO_4$溶液处理)的测定,其检出限可达 0.10 μg/mL。测定鸟嘌呤和腺嘌呤的浓度或者它们的比值与测定核酸本身的浓度具有同样的重要性。检测这些物质的升高水平可以指示某些疾病的发生[4]。利用预处理玻碳电极,我们建立了同时或分别测定 DNA 分子中鸟嘌呤和腺嘌呤的吸附溶出伏安法[5],该方法简单、实用。分别测定鸟嘌呤和腺嘌呤的检出限为 4.5 ng/mL(3.0×10^{-8} mol/L)和 4.0 ng/mL(3.0×10^{-8} mol/L)。酸变性 DNA 在同样条件下出现对应于鸟嘌呤和腺嘌呤基团的氧化峰,峰电流与 DNA 的浓度在 0.25～5.0 μg/mL 范围显线性。利用吸附溶出伏安法研究了热变性单链 DNA (ssDNA)在电化学修饰玻碳电极上的电化学氧化和 ssDNA 在修饰玻碳电极上的富集机理,建立了 ssDNA 的检测方法[6],对热变性小牛胸腺 ssDNA 的检出限为 0.2 μg/mL。

2 DNA 与电活性小分子间的作用与序列检测

随着生命科学的发展,基因芯片与 DNA 测序或基因表达谱鉴定的研究已成为最活跃的研究领域之一。研究 DNA 与其它分子之间的相互作用,可为进一步寻找 DNA 探针提供了有价值的信息。例如电活性小分子与 DNA 的作用研究可以选择电化学 DNA 传感器的杂交指示剂,并用于研究 DNA 在修饰电极上的电化学行为[7]。我们用电化学方法研究了耐尔蓝分别和吸附在微金盘电极上的小牛胸腺 ss、dsDNA 的相互作用[8]。耐尔蓝通过静电作用和 ssDNA 结合,而在与 dsDNA 作用时,静电和插入作用同时存在。

收稿日期: 2002-12-23 **通讯联系人**: 鞠 先
基金项目: 国家自然科学基金(No. 29975013, 29835110);江苏省自然科学基金(BK99030);教育部博士点基金(No. 2000028403);长春应用化学研究所电分析化学国家重点实验室

© 1994-2006 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

耐尔蓝在 ssDNA/ Au 电极和 dsDNA/ Au 电极上响应电流的不同表明耐尔蓝可用作为识别 DNA 杂交的电化学指示剂。

通过共价键合法将酵母 ssDNA 固定到修饰金电极表面,它与溶液中互补的单链 DNA(cDNA)进行选择性杂交,在电极表面形成 dsDNA。用亚甲蓝作为电活性指示剂对 DNA 的分子识别过程进行监测,杂交过程导致亚甲蓝的峰电流增高[9]。测得亚甲蓝在 ssDNA 和 dsDNA 修饰电极上的吸附常数分别为 3.3 × 10^3 L/ mol 和 6.6 × 10^3 L/ mol,因而 dsDNA 对 MB 有更高的亲和力。该传感器可被用于选择性测定天然互补的酵母 DNA 序列。

3　PCR-电化学 DNA 序列检测方法

通过共价键合法将酵母单链 DNA 固定到半胱胺自组装修饰的金电极表面,以此制备得另一种酵母 DNA 传感器,并用表观电容法监测其制备过程。将 DNA 传感器与溶液中互补序列的单链 DNA 进行选择性杂交,在电极表面形成双链 DNA。同时,用 $FcPF_6$作为电活性指示剂对 DNA 分子的识别过程进行监测,与互补序列 DNA 的杂交过程导致 $FcPF_6$峰电流增大了 97.6 %,因此该 DNA 传感器可用于测定天然酵母的 DNA 序列。

基于聚合酶链式反应(PCR)的扩增技术,以显著的特异性、高效率和真实性的特点,在生命科学领域产生巨大影响,成为核酸分子水平研究的基础和最为广泛应用的技术。PCR 扩增技术是体外酶促反应合成特异性 DNA 的一种方法。它利用人工合成引物介导的 DNA 聚合酶促反应,扩增位于两段已知序列之间的 DNA 片断。其主要步骤为:人工合成一对寡核苷酸引物,与待扩增 DNA 片断两条链的两端序列分别互补,由高温变性、低温复性和室温延伸组成一个周期,循环进行,使目标 DNA 得以扩增。也就是说,PCR 就是在引物引导下反复进行"热变性 - 复性 - 延伸"而扩增 DNA 的循环过程。PCR 技术具有特异性强、灵敏度高、简便快捷和对样品要求低等特点。但是也有可能引起单核苷酸的错误掺入、会出现假阳性或假阴性结果等局限性。近年来,PCR 的实时定量技术渐趋成熟和商品化,这些定量方法多结合以荧光素标记探针法来检测靶基因。我们利用 PCR 技术扩增已知序列的短链乙肝病毒 DNA 片断,将扩增产物单链 DNA 以共价键合的方式固定在巯基乙酸自组装单层金电极上,通过杂交以及错配实验。分别用耐尔蓝、FcPF6 和 $[Os(bpy)_2Cl_2]^+$为电活性杂交指示剂建立了测定 1 × 10^4拷贝(相当于 15 zmol)的乙肝病毒 DNA 片断的电化学检测方法[8-11]。我们研究了这几种电活性指示剂与 ss-和 ds-乙肝病毒 DNA 相互作用的机理。应用多种电化学方法(包括循环伏安、示差脉冲伏安法、交流阻抗法以及计时安培法等)和扫描电子显微镜、X 射线光电子能谱等方法对实验涉及的电极进行了测定和表征。实验证明耐尔蓝和乙肝病毒 DNA 的相互作用包含静电和插入作用[8];$FcPF_6$与乙肝病毒 DNA 相互作用为静电吸附[10]。裸金电极、巯基乙酸修饰金电极、HBV dsDNA 修饰金电极和 HBV ss-DNA 修饰金电极在 8.0 × 10^{-4} mol/ L $FcPF_6$溶液中的示差脉冲伏安图显示,阳极峰分别为 3.856,4.539,6.592 和 16.18 μA,阴极峰分别为 6.611,7.451,16.41 和 24.24 μA。错配过的 HBV ssDNA 修饰金电极对 $FcPF_6$的响应未降低,而与 cDNA 杂交后形成 HBV ssDNA 修饰金电极的电流响应相应降低;而 $[Os(bpy)_2Cl_2]^+$与乙肝病毒 DNA 作用为沟槽作用[11],图 3 为 $[Os(bpy)_2Cl_2]^+$分别在裸金电极(a)、HBV ssDNA/ Au (b)和杂交后得到的 HBV dsDNA/ Au (c)上的循环伏安曲线。与 HBV ssDNA/ Au 电极相比,$[Os(bpy)_2Cl_2]^+$在与小牛胸腺 ssDNA 错配后电极(d)上的峰电流和峰电位几乎没有变化,表明小牛胸腺 ssDNA 不能与电极上的 HBV ssDNA/ Au 杂交。

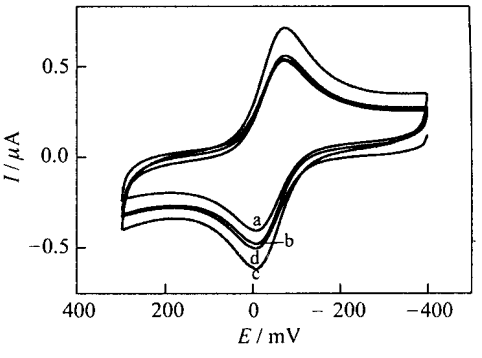

Fig. 1　Cyclic voltammograms of 0.50 mmol/ L [Os(bpy)$_2$Cl$_2$]$^+$ at bare gold (a), HBV ss-DNA/ Au (b) and HBV ds-DNA/ Au (c) electrodes and at HBV ss-DNA/ Au electrode treated with calf-thymus ssDNA (d) at 400 mV/ s.

© 1994-2006 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

参考文献:

[1] Bakker E, Telting-Diaz M. Anal. Chem. [J], 2002, **74**: 2781.
[2] Paleĉek E. Bioelectrochem. Bioenerg. [J], 1986, **15**: 275.
[3] Wang H S, Ju H X, Chen H Y. Electroanalysis [J], 2001, **13**: 1105.
[4] Sheng R, Ni F, Cotton T M. Anal. Chem. [J], 1991, **63**: 437.
[5] Wang H S, Ju H X, Chen H Y. Electroanalysis [J], 2002, **14**: 1615.
[6] Wang H S, Ju H X, Chen H Y. Anal. Chim. Acta [J], 2002, **461**: 243.
[7] **陆晓军, 鞠　先. 分析化学** [J], 2003, **31**(1):
[8] Zhu Y L, Ye Y K, Ju H X. Bioconj. Chem. [J], in reviewed.
[9] Gu J Y, Lu X J, Ju H X. Electroanalysis [J], 2002, **14**: 949.
[10] Ye Y K, Zhao J H, Yan F, Zhu Y L. Ju H. X. Biosen. & Bioelec. [J], inpress.
[11] Ju H X, Ye Y K, Zhao J H, Zhu Y L. Anal. Biochem. [J], 2003, **313**:255.

DNA Electrochemical Behaviors, Recognition and Detection on Modified Electrodes

YE Yong-kang, JU Huang-xian *

(Department of Chemistry, Nanjing University, Nanjing 210093*)*

Abstract: Research works on DNA electrochemical behaviors, recognition and detection on the chemically modified electrodes which were done in our group were reviewed.

Keywords: DNA; Chemically modified electrodes; DNA sensors

© 1994-2006 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net