

文章编号:1006-3471(2001)03-0276-05

长链 DNA 在金基底上的固定化和电化学标记

周剑章,吴玲玲,董丽琴,林种玉,颜佳伟,董平,包烨,林仲华*

(厦门大学固体表面物理化学国家重点实验室,化学系,物理化学研究所,福建 厦门 361005)

摘要: 本文提出在金基底上用阳离子聚电解质——聚二烯丙基二甲基胺氯化物 (poly (diallyldimethylammonium chloride), PDDA) 自组装膜固定长链 DNA 的方法,用 Diffuse Reflectance Infrared, XPS 和 STM 技术进行表征,并对 DNA 杂交进行电化学标记。

关键词: 聚电解质;DNA 固定化;电化学标记;STM;FT-IR,XPS

中图分类号: O 646

文献标识码: A

随着人类基因组计划的顺利实施,基于 DNA 探针的基因传感器、基因芯片的研究正成为基因组研究的一个热点^[1~4]。无论是在基因传感器和芯片研究中,还是在其他诸如 DNA 与药物小分子的相互作用研究中,DNA 在基底上的固定化都是一个令人感兴趣的课题。要构筑基因传感器、基因芯片,首先必须先将 DNA 探针固定到固体表面,才能通过杂交反应检测其互补片段。而基因芯片的 DNA 固定化方式主要有片上就位合成和微量点样两大类。利用就位合成法可以制作较高密度的基因芯片,但目前只能处理长度小于 25 个碱基的寡聚核苷酸。微量点样法用于制作中等密度的芯片,它的优点是不仅可处理寡聚核苷酸,也可处理链较长的 cDNA^[5,6]。但寡聚核苷酸点阵芯片 (ONA) 的发展较 cDNA 点阵芯片 (CDA) 更为成熟,主要体现在芯片制作 (DNA 固定化) 的技术方面。探索构筑高密度、低成本的基因芯片的技术始终是研究者感兴趣的课题。从发展 CDA 芯片的角度讲,研究长链 DNA 的固定化方法具有相当实际的意义。我们认为采用分子自组装技术将 DNA 固定于基底 (如金) 上并进一步用于制作高密度的基因芯片是一条值得开发的途径。本文探索了采用分子自组装技术固定化 DNA 于金基底上的方法,采用谱学和电化学方法进行了表征,STM 实验表明自组装膜具有一定的有序性,随之固定其上的 DNA 也顺着这个结构进行吸附。

当前基因芯片主要采用的是荧光标记的检测方法。根据一些电活性分子与 ssDNA 和 dsDNA 相互作用以及引起的电化学反应存在明显的差异,我们研究组一直致力于利用这种差异发展 DNA 杂交的电化学标记方法^[7]。研究电标记的杂交检测方式将开辟另外一条制作更方

收稿日期:2001-03-10

* 通讯联系人

基金项目:国家自然科学基金(29803007)、教育部科学技术研究重点项目(99177)和教育部博士点基金资助项目。

便更廉价的基因芯片的途径.

1 实验

实验用 PDDA 购自 Sigma, 小牛胸腺 DNA (CT DNA) 购自北京华美公司 ($OD_{260}/OD_{280} > 1.8, 10^5 \sim 10^7$ Dalton), 硫堇购自上海化学试剂公司, 使用前未经进一步纯化. 其他试剂均为分析纯. DNA 溶液采用 Tris-HCl (5 mmol/L Tris, 50 mmol/L NaCl, pH 7.3) 配制, 浓度由紫外吸收光谱分析标定. ssDNA 由天然 CT DNA 热变性得到. Diffuse Reflectance FT-IR 试验采用 Nicolet 740 光谱仪. XPS 试验采用 VG ESCA-LAB MK-II 型光谱仪, 激发光源为 Mg K line (50 eV). STM 实验使用 DI 公司的 Nanoscope IIIa, 以单晶 Au(111) (根据文献[8]制作) 为基底. 吸光度由岛津 UV-2100 紫外可见光谱仪测得. 电化学实验使用 CHI 660A 电化学工作站, 电化学电解槽采用三电极体系, 工作电极为金修饰电极, 辅助电极为铂电极, 参比电极为饱和甘汞电极, 实验前通氮气除氧 20 min. 实验用超纯水来自 Millipore Milli-Q (18 M Ω) 系统.

2 结果与讨论

2.1 DNA 在金电极上的固定化

实验用金电极依次用 3.5μ 、 1.5μ 、 0.5μ 和 0.05μ 氧化铝粉末抛光, 经浓硫酸处理 5 min 后, 分别用丙酮、乙醇, 和超纯水超声清洗 10 min. 将上述的金电极浸泡在 1% 的 PDDA 溶液中 30 ~ 60 min 进行 PDDA 分子自组装, 取出后用超纯水清洗, 再浸入 DNA 溶液于 4 $^\circ$ C 下经历 12 ~ 24 h 以固定化 DNA 分子, 最后用超纯水清洗备用.

2.2 Diffuse Reflectance FT-IR 与 XPS 表征

图 1 示出 dsDNA/PDDA 和 ssDNA/PDDA 膜的 Diffuse Reflectance FT-IR 谱图, 图中 1240 cm^{-1} 与 1084 cm^{-1} 处的峰可分别归属于 DNA 链上磷酸基团反对称的和对称的伸缩振

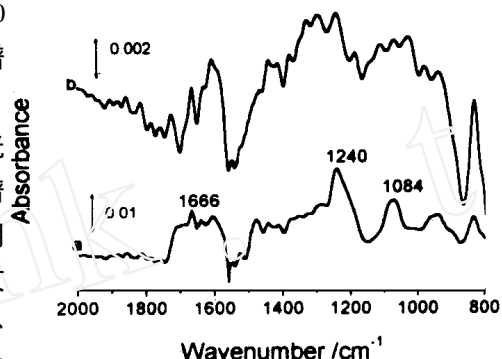


图 1 dsDNA/PDDA/Au (a) 和 ssDNA/PDDA/Au 的红外漫反射谱图

Fig. 1 Diffuse reflectance infrared spectra of dsDNA/PDDA/Au (a) and ssDNA/PDDA/Au (b)

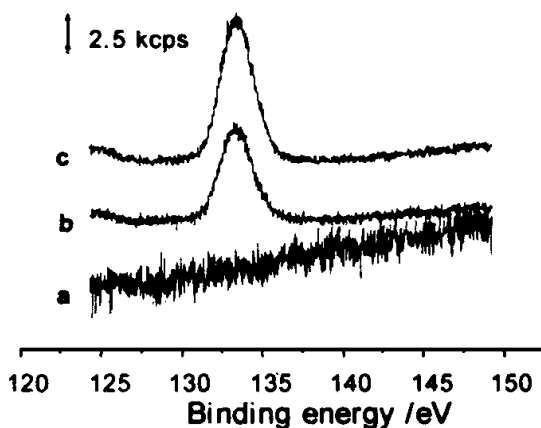


图 2 PDDA (a), dsDNA/PDDA (b) 和 ssDNA/PDDA (c) 在金的 XPS P2p 谱图

Fig. 2 The P2p XPS spectra of PDDA/Au (a), dsDNA/PDDA/Au (b) and ssDNA/PDDA/Au (c)

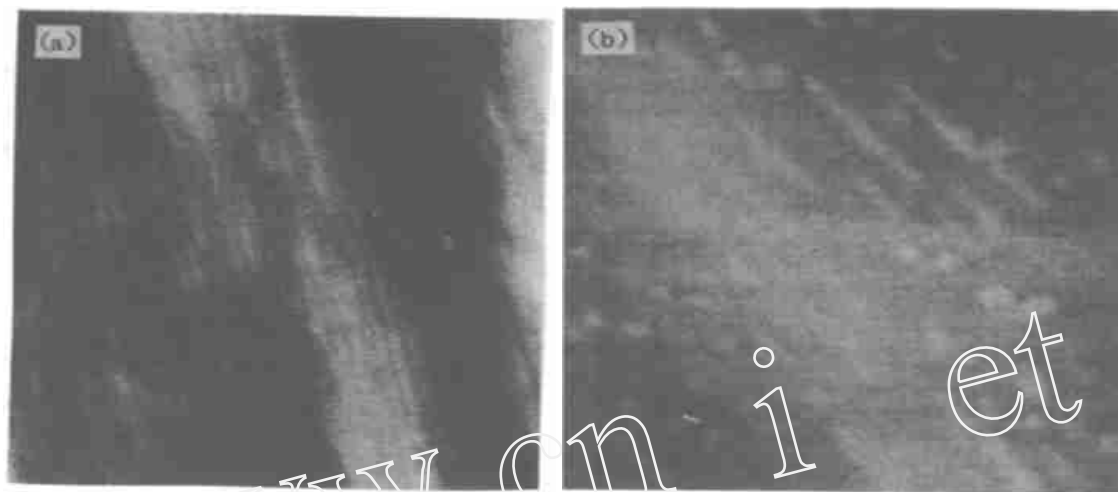


图 3a PDDA 自组装膜的 STM 图象

Fig. 3a STM images of PDDA self-assembling films on Au(111), 100 × 100 nm, current mode, Z range: 0.58 nA, setpoint: 0.88 nA, Vbias: 0.20 V

图 3b DNA/ PDDA 的 STM 图象

Fig. 3b STM images of DNA/ PDDA films on Au(111), 100 × 100 nm, current mode, Z range: 1.57 nm, setpoint: 0.20 nA, Vbias: 0.28 V

动, 1666 cm^{-1} 处的峰则对应于 DNA 碱基中双键的伸缩振动^[9]. 据图可见, dsDNA 和 ssDNA 两者的图相近. 图 2a、b、c 分别是 PDDA、dsDNA/ PDDA 和 ssDNA/ PDDA 的 XPS P2p 谱. 如图可知, 无论是 dsDNA/ PDDA 抑或 ssDNA/ PDDA 表面都有大量的 P 元素存在, 而 PDDA 膜的表面却是没有 P 元素的. 这就证明了 DNA 在 PDDA 膜表面上的吸附.

2.3 STM 表征

图 3a 是 PDDA 自组装膜 STM 图象, 由图可见, 表面的 PDDA 呈现二维有序的线条状排列. 而其后接着固定于 PDDA 膜上的 DNA 是顺着 PDDA 的线条状结构进行吸附的 (见图 3b). 由于长链 DNA 具有容易弯曲折绕的特点, 因而我们认为在 STM 图中所观察到的一些凸出的岛状结构当为 DNA 长链上一些未被吸附的片段缠绕聚集的结果, 这同 HOPG 电极上观察到的长链 DNA 的 STM 图象相吻合^[10].

2.4 DNA 杂交的电化学标记

图 4a、b、c、d 是 $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+/2+}$ 分别在裸金、PDDA/ Au、dsDNA/ PDDA/ Au 和 ssDNA/ PDDA/ Au 电极上氧化还原反应的 CV 曲线. 如图可知, 金电极表面自组装上 PDDA 膜后 $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+/2+}$ 的氧化还原电流峰大降低. 这是由于电极表面修饰的 PDDA 聚阳离子阻碍了 $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+/2+}$ 的氧化还原. 对 dsDNA/ PDDA/ Au 电极则在一定的电位范围内, $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+/2+}$ 氧化反应的峰电流 I_{pa} 与扫描速度 成正比, 而在 ssDNA/ PDDA/ Au 电极上 $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+/2+}$ 的 I_{pa} 与 $^{1/2}$ 或 均不成正比. 这说明对 dsDNA/ PDDA/ Au 电极

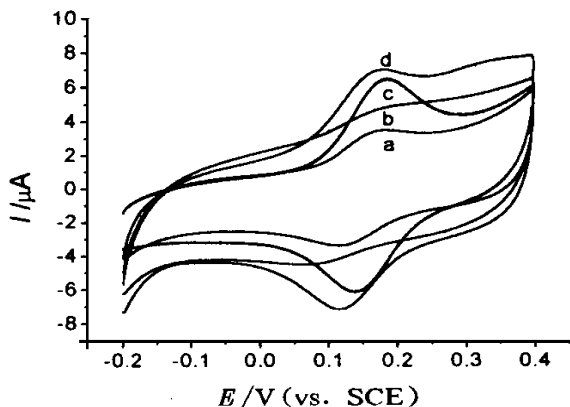
图4 $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+/2+}$ 在不同电极上的循环伏安图

Fig. 4 Cyclic voltammograms of $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+/2+}$ (50 $\mu\text{mol/L}$) at (a) bare Au electrode, (b) PDDA/Au, (c) ssDNA/PDDA/Au, (d) dsDNA/PDDA/Au, 5 mmol/L pH 7.3 Tris-HCL buffer containing 50 mmol/L NaCl, scan rate: 100 mV/s

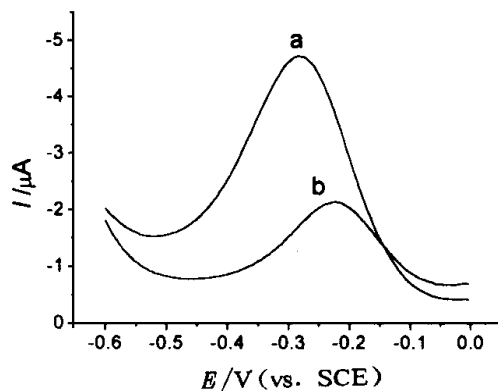


图5 吸附硫堇在 DNA/ PDDA 电极上的微分脉冲伏安图

Fig. 5 Differential pulse voltammograms of thionine before (a) and after (b) DNA hybridization at DNA/ PDDA/ Au electrodes

$[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+/2+}$ 在其上的反应是个表面过程,而在 ssDNA/ PDDA/ Au 电极上,则是混合控制的过程。 $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+/2+}$ 在 dsDNA/ PDDA/ Au 与 ssDNA/ PDDA/ Au 电极上伏安图的氧化还原峰电位及峰电流的差异也表明 $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+/2+}$ 与 ssDNA 和 dsDNA 的相互作用方式不同。文献报道,在一定的离子强度 ($> 40 \text{ mmol/L}$) 下, $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+/2+}$ 与 dsDNA 的相互作用主要是嵌入模式,而与 ssDNA 的相互作用则比较复杂^[11],这同我们的实验结果是相符合的。据此,可以利用 $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+/2+}$ 与 ssDNA 和 dsDNA 在指定电位下氧化还原反应电流值的差异来检测 DNA 杂交与否,即对 DNA 杂交进行电化学标记。

我们还研究了吩噻嗪衍生物硫堇与 DNA 相互作用后的氧化还原行为,图 5 为杂交前后 DNA/ PDDA/ Au 电极上吸附的硫堇的微分脉冲伏安曲线,从图中可见,杂交后 DNA/ PDDA/ Au 电极上硫堇的电流峰明显下降。因而利用硫堇在杂交前后的不同电化学响应,有可能将硫堇作为检测 DNA 杂交的标记物。

Immobilization of Long-Strand DNA onto Gold Surface and Electrochemical Labeling of Hybridization of DNA

ZHOU Jian-zhang ,WU Ling-ling ,DONG Li-qin ,LIN Zhong-yu ,

YAN Jia-wei ,DONG Ping ,BAO Yue ,LIN Zhong-hua

(*State Key Lab. for Phys. Chem. of the Solid Surface, Dept. of Chem. ,*

Inst. of Phys. Chem. , Xiamen Univ. , Xiamen 361005, China)

Abstract : Poly(diallyldimethylammonium chloride) (PDDA) was used to facilitate long-strand DNA immobilization onto gold surface using self-assembly method. Characterization of the PDDA self-assembled film and subsequently immobilized DNA were carried out by Diffuse Reflectance Infrared, XPS, STM and electrochemical measurements. Hybridization of DNA was labeled by electrochemical method.

Key words : Polyelectrolyte , Immobilization , Electrochemical labeling , STM , FT-IR , XPS

References :

- [1] Boncheva M, Schibler L, Lincoln P, et al. Design of oligonucleotide arrays at interfaces[J]. *Langmuir*, 1999,15:4 317.
- [2] Thompson M, Furtado L M. High density oligonucleotide DNA probe arrays for the analysis at target DNA [J]. *Analyst*, 1999,124:1 133.
- [3] Taton T A, Mirkin C A, Letsinger R L. Scanometric DNA array detection with nanoparticle probes[J]. *Science*, 2000,289:1 757.
- [4] Reichert J, Csáki A, Köhler J M, et al. Chip-based optical detection at DNA hybridization by means of nanobead labeling[J]. *Anal. Chem.*, 2000,72:6 025.
- [5] Lipshuze R J, Fodor S P A, et al. High density synthetic oligonucleotide arrays[J]. *Nature Genetics*, 1999, 21(1):120.
- [6] Cheung V G, Morley M, et al. Making and reading microarrays[J]. *Nature Genetics*, 1999,21(1):115.
- [7] Wu L L, Zhou J Z, XU J, et al. Electrochemical Labeling of Nucleic Acid, Extended Abstracts of 10th National Congress of Electrochemistry of CHINA[C], Hang Zhou, 1999, D004.
- [8] Roe D K, Gerischer H. Preparation of spherical single crystal electrodes for use in electrocrystallization studies [J]. *J. Electrochem. Soc.*, 1963,110:350.
- [9] Tsuboi M. Infrared and Raman Spectroscopy: Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry Vol. 1[M]. New York and London: Academic Press, 1974.
- [10] Wu L L, Zhou J Z, Luo J, et al. Oxidation and adsorption of deoxybonucleic acid at highly ordered pyrolytic graphite electrode[J]. *Electrochimica Acta*, 2000, 45:2 923.
- [11] Pang D W, Abruna H D. Micromethod for the investigation of the interactions between DNA and redox-active molecules[J]. *Anal. Chem.*, 1998,70:3 162.