

二茂铁与 DNA 作用的表面电化学研究

陈灿辉 李红* 周剑章#

(华南师范大学化学与环境学院 广州 510631;

厦门大学化学系 固体表面物理化学国家重点实验室 厦门 361005)

摘要 在研究碳纳米管电极上二茂铁电化学性质的基础上,应用二茂铁修饰电极和 DNA 修饰电极研究了二茂铁与小牛胸腺 DNA 的相互作用。结果表明,修饰电极上的二茂铁都呈现一对明显的氧化还原峰,二茂铁修饰电极与 DNA 的作用表现为氧化还原峰电流减小,与溶液中的两者作用情况类似,而 DNA 修饰电极与二茂铁的作用则表现为氧化还原峰电流增大。扫描电镜结果也证实了两种修饰电极上的二茂铁与 DNA 间的作用。此外,还讨论了二茂铁与 DNA 间的作用模式。

关键词 二茂铁 小牛胸腺 DNA 表面电化学 碳纳米管修饰电极

Surface Electrochemical Studies of Ferrocene and Its Interaction with DNA

Chen Canhui, Li Hong*, Zhou Jianzhang#

(School of Chemistry and Environment, South China Normal University, Guangzhou 510631;

State Key Laboratory for Physical Chemistry of the Solid Surface, Department of Chemistry, Xiamen University, Xiamen 361005)

Abstract The interaction of ferrocene with calf thymus DNA has been investigated by using the ferrocene and/or DNA modified electrodes based on the electrochemical properties of ferrocene on the carbon nanotube-modified electrode. The results show that an obvious redox peak for ferrocene is exhibited on the modified electrode. There exists a decrease for the redox peak currents on the electrode modified by ferrocene in the presence of DNA, which is similar to their interaction in solution. However, when the electrode modified by DNA is used as the working electrode, the redox peak current appears an increase compared with that by using the carbon nanotube-modified electrode. The interaction between ferrocene and DNA is also proved by SEM. In addition, the interaction mode of ferrocene with DNA is discussed.

Key words Ferrocene, Calf thymus DNA, Surface electrochemistry, Carbon nanotube-modified electrode

小分子化合物与脱氧核糖核酸(DNA)的相互作用已引起了研究者的广泛关注。目前,紫外-可见光谱法^[1-3]、荧光光谱法^[2-4]、Raman 光谱法^[5]、X 射线晶体衍射法^[6,9]、NMR^[7,9]、粘度法^[2]、凝胶电泳技术^[8,9]、原子力显微镜(AFM)^[9]等技术已成功应用于该领域的研究。随着电化学技术的不断深入,使得电化学方法可获得许多其它方法无法得到的信息,采用电化学方法研究电活性分子与 DNA 相互作用也日益受到重视。Bard 等^[10]将电化学方法应用于研究溶液中 DNA 与电活性金属配合物之间的相互作用,从而获得了扩散系数的变化及配合物与 DNA 的键合常数及键合位点等参数,但该方法 DNA 用量大,因此,庞代文等^[11]应用 DNA 修饰电极发展了表面电化学方法。

碳纳米管是 1991 年发现的一种具有奇特的电学性能、明显的量子效应、大比表面积、高稳定性和强吸附性的材料。经王水氧化的碳纳米管末端大多数开管,表面被活化,极易引入羧基和羟基等基团,这些基团有助于二茂铁和 DNA 的固定与稳定,因此本文在碳纳米管上制备了二茂铁修饰电极和 DNA 修饰电极,并在旋转圆盘电极法研究溶液中二茂铁与 DNA 相互作用的基础上^[12],进一步研究修饰电极上的二茂铁或 DNA 与溶液中的 DNA 或二茂铁作用,获得了一些有意义的结果,希望能为 DNA 电化学传感

陈灿辉 女, 24 岁, 硕士生, 现从事生物电化学研究。 *联系人, E-mail: lihong@scnu.edu.cn

广东省教育厅自然科学基金(203020)和广州市科委(2004J1-C0091)资助项目

2005-12-08 收稿, 2006-04-24 接受

器在特定序列 DNA 片断的识别和检测及 DNA 的损伤与修复等方面的应用研究提供依据。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

双十六烷基磷酸(DHP),Fluka;碳纳米管(CNT)由华中师范大学纳米材料研究中心提供,按照文献方法^[13]进行纯化;三羟甲基氨基甲烷(Tris,含量 99%);二茂铁(Fc,含量 >98%);Fc先用二甲亚砜溶解,再用0.10mol/L NaCl + 0.02mol/L Tris (pH=7.2)缓冲溶液以1:1的体积比混合。小牛胸腺DNA(华美公司),其浓度以核苷酸计,在260nm波长下测定^[10],摩尔吸光系数取 $6600\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$;实验用水为二次重蒸馏水;其它试剂均为分析纯。

Autolab PGSTAT-30 电化学综合测试仪(荷兰),PHS-3C精密pH计(上海雷磁仪器厂)。实验采用常规三室电解池,以CNT修饰玻碳(GC)电极作为工作电极,GC电极的面积为 0.126cm^2 ,对电极为大面积铂丝,参比电极为饱和甘汞电极(SCE)。

1.2 实验条件

微分脉冲伏安测定的调制电压为25mV,阶跃电位为5mV。实验在 $27\pm 2^\circ\text{C}$ 下进行。

1.3 碳纳米管修饰电极(CNT-GC)的制备

取3mg CNT和5mg DHP,加入5mL二次蒸馏水,超声分散20min得到均匀的浅黑色悬浮液。GC电极使用前先用 $0.25\mu\text{m Al}_2\text{O}_3$ 糊在配套的抛光垫上抛光,然后在二次重蒸水中超声波清洗10min,红外灯下烘干;再用微量进样器取10 μL 上述CNT分散液滴加到抛光的GC电极表面,红外灯下挥发掉溶剂即可。

1.4 二茂铁修饰电极(Fc/CNT-GC)的制备

采用微量进样器取10 μL 二茂铁乙腈饱和溶液滴加到碳纳米管修饰电极上,于冰箱中 4°C 下放置12h取出,用Tris缓冲溶液浸泡20min,除去未吸附的二茂铁,用二次蒸馏水浸洗,即制得吸附固定的Fc/CNT-GC电极。

1.5 DNA修饰电极(DNA/CNT-GC)的制备

将5mg DNA与50 μL Tris缓冲溶液混合,搅拌均匀,然后小心地涂覆到碳纳米管修饰电极上,于冰箱中 4°C 下放置12h取出,用Tris缓冲溶液浸泡4h,除去未溶解和未吸附的DNA,再用二次蒸馏水浸洗,即制得DNA/CNT-GC电极。

2 结果与讨论

2.1 修饰电极上二茂铁的电化学行为

图1和图2分别为CNT修饰电极在含二茂铁的溶液中和二茂铁修饰电极在缓冲溶液中的循环伏安图。可以发现,图1和图2的氧化峰电流均随扫描速度的增大而增大,然而,图1的氧化峰电流($I_{p,a}$)与扫速平方根($v^{1/2}$)呈线性,说明溶液中的二茂铁在CNT修饰电极的反应主要由扩散控制,而图2中 $I_{p,a}$ 与 $v^{1/2}$ 呈非线性,说明修饰电极的二茂铁在缓冲溶液中的反应主要由表面电化学过程控制,并由此计算可以得出二茂铁在CNT修饰电极上的吸附量为 $9.9\times 10^{-11}\text{mol}/\text{cm}^2$ (见图2中的插图)。

2.2 修饰电极上二茂铁与DNA的相互作用

在研究Fc/CNT-GC电极上二茂铁的伏安行为的基础上,进一步利用该修饰电极研究了修饰电极上二茂铁与DNA的相互作用。将已经稳定的Fc/CNT-GC电极放到含 $5\mu\text{mol}/\text{L}$ DNA缓冲溶液中,在 $-0.1\sim 0.4\text{V}$ 电位范围连续扫描20次,与Fc/CNT-GC电极在不含DNA缓冲溶液中的氧化峰电流(图3曲线1)相比,Fc/CNT-GC电极在DNA缓冲溶液中的氧化峰电流减小了 $(10\pm 2)\%$,峰电位不变(图3曲线2)。结合文献报道的CD光谱数据,二茂铁两个环戊二烯环的距离为 0.336nm ^[14],二茂铁较难通过插入方式与DNA结合^[15~17],可能与DNA分子通过堆积作用发生沟面结合^[18],与溶液中的两者作用情况类似^[12]。因此,氧化峰电流减小可能是由于电极上的二茂铁与DNA发生了沟面结合,DNA包覆二茂铁,使得电极表面的电化学活性点减少。

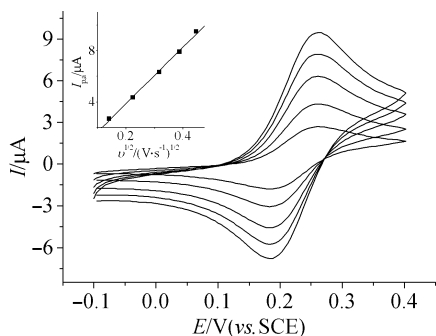


图 1 CNT 修饰电极在含二茂铁溶液中的循环伏安图

Fig. 1 Cyclic voltammograms of ferrocene on the CNT-modified electrode

插图为氧化峰电流 ($I_{p,a}$) 与扫速平方根 ($v^{1/2}$) 的关系图

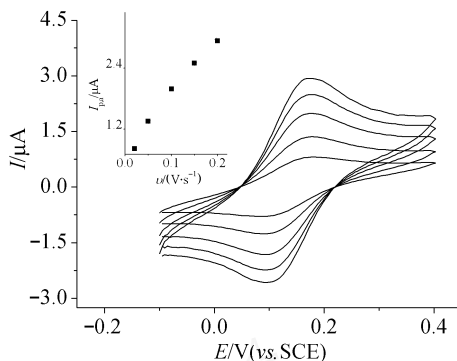


图 2 二茂铁修饰电极在缓冲溶液中的循环伏安图

Fig. 2 Cyclic voltammograms of the ferrocene modified electrode in buffer solution

插图为氧化峰电流 ($I_{p,a}$) 与扫速 (v) 的关系图

进而研究了按图 3 曲线 2 获得的 Fc-DNA/CNT-GC 电极在缓冲溶液中的电化学行为(图 4)。从图可以发现,峰电流也随扫描速度的增大而增加,且与扫描速度也呈线性关系,这与 Fc/CNT-GC 电极在缓冲溶液中的现象一样,说明修饰电极上的电活性物质在缓冲溶液中的反应也主要由表面电化学过程控制,电极上的二茂铁与 DNA 的相互作用不影响它的表面电化学过程,且可以求得电活性二茂铁的吸附量为 $7.4 \times 10^{-11} \text{ mol/cm}^2$,比不存在 DNA 时小,进一步说明二茂铁与 DNA 发生了沟面结合。

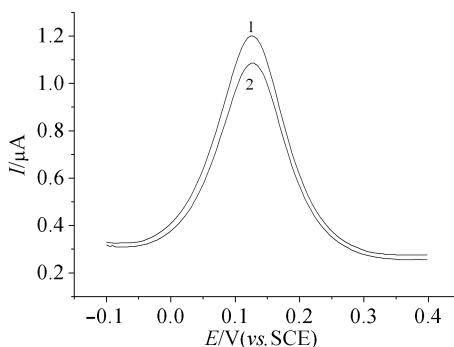


图 3 Fc/CNT-GC 电极在 DNA 缓冲溶液中前(1)和后(2)的微分脉冲图

Fig. 3 Differential pulse voltammograms of Fc/CNT-GC electrode in buffer solution in the absence (1) and presence (2) of DNA

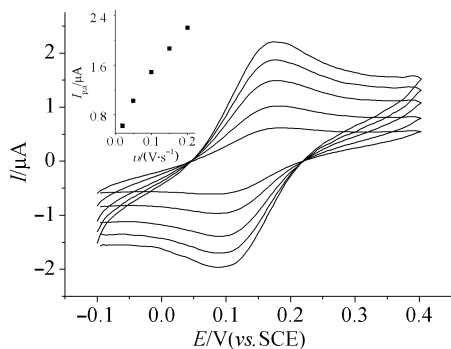


图 4 Fc-DNA/CNT-GC 电极在缓冲溶液中的循环伏安图

Fig. 4 Cyclic voltammograms of Fc-DNA/CNT-GC electrode in buffer solution

插图为 $I_{p,a} \sim v$ 关系图

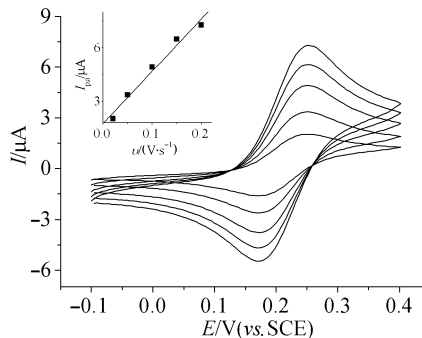


图 5 DNA 修饰电极在 0.5mmol/L Fc 溶液中的循环伏安图

Fig. 5 Cyclic voltammograms of ferrocene on DNA modified electrode

插图为 $I_{p,a} \sim v$ 关系图

2.3 修饰电极上 DNA 与二茂铁的相互作用

为了更深入探讨电极上二茂铁与 DNA 之间的相互作用,改用 DNA 修饰电极来研究。图 5 给出了 DNA/CNT-GC 电极在 0.5mmol/L 二茂铁溶液中的循环伏安图。从图可以发现,峰电流也随扫描速度的增大而增加,且与扫描速度也呈线性关系,说明溶液中的二茂铁通过与修饰电极上的 DNA 作用而组装到电极上,因此二茂铁在 DNA 修饰电极上的反应呈现出表面电化学过程控制的特征,通过计算得出二茂

铁在 DNA/CNT-GC 电极上的固定量为 $2.5 \times 10^{-10} \text{ mol/cm}^2$ 。该值与 Fc/CNT-GC 电极相比,电活性二茂铁在电极上的固定量增加了 2.5 倍,进一步表明溶液中的二茂铁与电极上的 DNA 可能发生了沟面结合作用,使得二茂铁富集到电极表面。

同样,继续测定了由图 5 获得的稳定的 DNA-Fc/CNT-GC 电极在缓冲溶液中的循环伏安图。从图 6 可见,峰电流仍随扫描速度的增大而增加,以 $I_{p,a}$ 对 ν 作图,发现两者呈很好的线性关系,由此可以求出这时电活性二茂铁 DNA/CNT-GC 电极上的固定量为 $6.1 \times 10^{-11} \text{ mol/cm}^2$ 。与图 5 中 DNA/CNT-GC 在二茂铁溶液中的固定量相比,DNA-Fc/CNT-GC 电极在缓冲溶液中的吸附量减小了约 4 倍,这可能是由于二茂铁与 DNA 的沟面结合不是很强,外层的二茂铁不稳定,容易发生脱附所致。

2.4 扫描电镜(SEM)

为了确定修饰电极的二茂铁或 DNA 与溶液中的 DNA 或二茂铁作用前后的表面形貌,进行了 SEM 研究。图 7a 是石墨电极的 SEM 图,从图可见,石墨表面呈层状分布,当石墨修饰了 CNT 后,可以清晰地看到管状的 CNT(图 7b),当再在其上修饰二茂铁后,从图 7c 可以看到二茂铁分子吸附在羧化开管的 CNT 上,再与 DNA 作用后,可以看到该电极表面被 DNA 所覆盖(图 7d),表明二茂铁与 DNA 发生了作用,吸附于电极表面,使得电极表面形态发生了变化,同时验证了前面 DNA 包覆二茂铁从而使得电极表面的电活性点减少的结论。

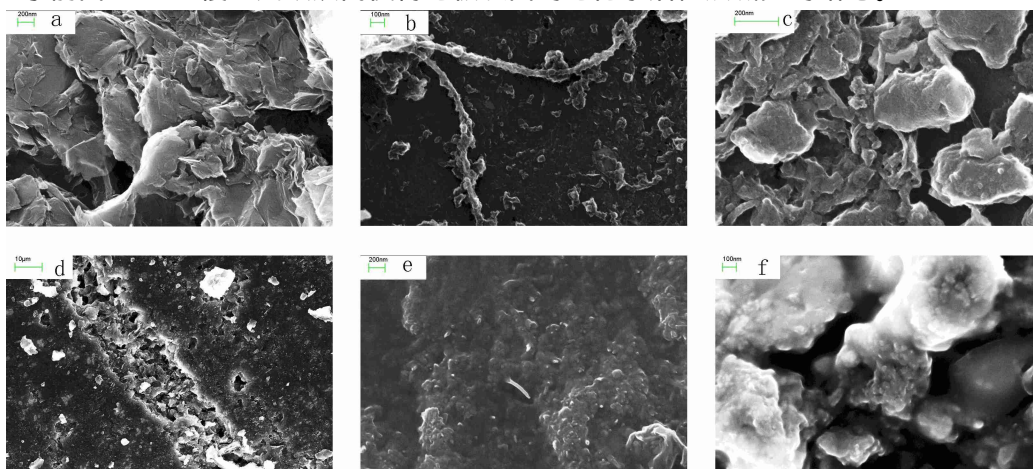


图 7 不同修饰电极的扫描电镜图

Fig. 7 SEM of the modified electrodes

(a) 石墨电极;(b) CNT-GC 电极;(c) Fc/CNT-GC 电极;(d) Fc-DNA/CNT-GC 电极;(e) DNA/CNT-GC 电极;(f) DNA-Fc/CNT-GC 电极

另外,将 DNA/CNT-GC 电极放到电镜下观察,可以看出 DNA 大分子在电极表面涂布得比较均匀(图 7e),它与二茂铁作用后,由图 7f 给出的 DNA-Fc/CNT-GC 电极的 SEM 图可知,电极表面形态发生了明显变化,二茂铁能通过 DNA 间的作用,富集于电极表面。图中黑白对比清晰,可能是二茂铁成团状富集的结果^[19]。

3 结论

采用电化学方法研究电活性分子与 DNA 相互作用可以获得许多其它方法无法得到的信息。本文在研究碳纳米管电极上二茂铁电化学性质的基础上,应用二茂铁修饰电极和 DNA 修饰电极研究了二茂

(下转第 590 页)

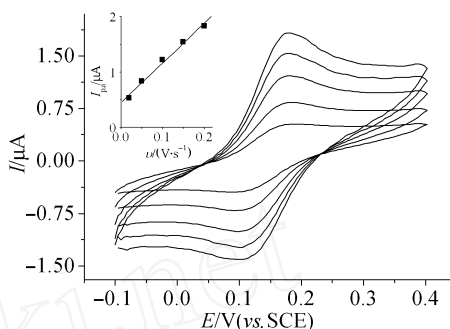


图 6 DNA-Fc/CNT-GC 电极在缓冲溶液中的循环伏安图

Fig. 6 Cyclic voltammograms of DNA-Fc/CNT-GC

electrode in buffer solution

插图为 $I_{p,a} \sim \nu$ 图

3 结论

本文采用 XPS 分析技术对微胶囊表面化学组成进行了分析。结果表明,ACA 微胶囊表面带负电荷的含 C 基团与带正电荷的含 N 基团的相对百分含量分别为 30.6% 与 60.4%,而海藻酸钠-聚赖氨酸-海藻酸钠(APA)微胶囊分别为 42.3% 与 30.0%。因此 ACA 微胶囊表面比 APA 带更多的正电荷,更有利于蛋白质吸附与细胞粘附。

参 考 文 献

- [1] G Orive, R M Hernandez, A R Gascon et al. *Nat. Med.*, 2003, 9: 104 ~ 107.
- [2] J K Suh, H W Matthew. *Biomaterials*, 2000, 21(24): 2589 ~ 2598.
- [3] W T Qi, W T Yu, Y B Xie et al. *Biochem. Eng. J.*, 2005, 25(2): 151 ~ 157.
- [4] 雄鹰,付颖丽,于炜婷等. *中华器官移植杂志*, 2003, 24(2): 86 ~ 88.
- [5] 王勇. 中国科学院大连化学物理研究所硕士学位论文. 大连: 1998.
- [6] D Briggs. 曹立礼,邓宗武译. *聚合物表面分析*. 北京: 化学工业出版社, 2001.
- [7] X L Tang, B C Zhang, Y Li et al. *J. Mol. Catal. A: Chemical*, 2005, 235(1-2): 122 ~ 129.
- [8] S K Tam, J Dusseault, S Pblizu et al. *Biomaterials*, 2005, 26(34): 6950 ~ 6961.

(上接第 585 页)

铁与小牛胸腺 DNA 的相互作用,然后采用扫描电镜进行电极表面的表征,发现修饰在碳纳米管电极上的二茂铁呈现一对明显的表面电化学反应控制的氧化还原峰。二茂铁修饰电极与 DNA 的作用表现为氧化还原峰电流减小,与溶液中的两者作用情况类似,而 DNA 修饰电极与二茂铁的作用则表现为氧化还原峰电流增大。两种修饰电极上二茂铁与 DNA 可能以较弱的沟面模式作用。扫描电镜结果显示,二茂铁修饰电极和 DNA 修饰电极与溶液中的 DNA 或二茂铁作用后,电极表面形貌发生了明显的改变。

参 考 文 献

- [1] A Silvestri, G Barone, G Ruisi et al. *J. Inorg. Biochem.*, 2004, 98(4): 589 ~ 594.
- [2] 蒋才武. *化学学报*, 2004, 62(7): 692 ~ 696.
- [3] Y L Zhou, Y Z Li. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 2004, 233: 129 ~ 135.
- [4] 杨功俊,徐静娟,陈洪渊. *高等学校化学学报*, 2004, 25(7): 1235 ~ 1239.
- [5] 王树玲,于俊生. *高等学校化学学报*, 2002, 23(9): 1676 ~ 1679.
- [6] U M Palanisamy, P Mallayan. *Inorg. Chim. Acta*, 2004, 357: 901 ~ 912.
- [7] C W Jiang. *Inorg. Chim. Acta*, 2004, 357: 3403 ~ 3406.
- [8] H Fazlul, Q Y Jun, D Hassan et al. *J. Inorg. Biochem.*, 2004, 98: 1261 ~ 1270.
- [9] M P rez-Cabr, G Cervantes, V Moreno et al. *J. Inorg. Biochem.*, 2004, 98: 510 ~ 521.
- [10] M T Carter, M Rodriguez, A J Bard. *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, 111(24): 8901 ~ 8911.
- [11] D W Pang, H D Abruña. *J. Anal. Chem.*, 1998, 70(15): 3162 ~ 3169.
- [12] 陈灿辉,李红,朱伟等. *物理化学学报*, 2005, 21(10): 1067 ~ 1072.
- [13] S C Tsang, Y K Chen, P J F Harris et al. *Nature*, 1994, 372: 159 ~ 162.
- [14] E F Paulus, L Schäfer. *J. Organomet. Chem.*, 1978, 144: 205 ~ 213.
- [15] D Osella, M Ferrali, P Zanello et al. *Inorg. Chim. Acta*, 2000, 306: 42 ~ 48.
- [16] 郭茂林,杨频,杨斌盛等. *中国科学(B 辑)*, 1995, 25(5): 517 ~ 524.
- [17] K Seio, M Mizuta, T Terada et al. *Tetrahed. Lett.*, 2004, 45: 6783 ~ 6786.
- [18] L V Popova, V N Babin, Y A Belousov et al. *Appl. Organomet. Chem.*, 1993, 7: 85 ~ 94.
- [19] 张成如,杨礼章,金文睿. *高等学校化学学报*, 1995, 16(12): 1935 ~ 1939.