

高序热解石墨与玻碳电极上 DNA 的氧化和吸附行为

周剑章 吴玲玲 罗瑾 林仲华*

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

摘要 在高序热解石墨(HOPG)电极上,采用微分脉冲伏安法(DPV)和电化学原子力显微镜法(ECAFM)探究小牛胸腺DNA(CT DNA)在电极表面的吸附.实验发现,控制电位下预极化对双链DNA在HOPG电极上的吸附有很大的影响,而对单链DNA影响不大.实验表明,在HOPG电极上ECAFM是DNA研究领域十分有用的技术,根据AFM图象,结合文献上的DNA吸附模型提出了CT DNA在HOPG电极表面DNA吸附的模型.本文还首次采用现场紫外可见反射光谱研究DNA的电化学行为,发现对研究DNA的吸附该技术具有比伏安法更高的灵敏度.

关键词 DNA, HOPG, 预极化, ECAFM, 紫外可见反射光谱

近年来,为了适应引起高度重视的DNA传感器,尤其是DNA固体集成传感器研制的需要,越来越多的研究者采用了固体电极来研究DNA的电化学氧化还原及其在电极表面的吸附行为^[1~8].

已有的研究发现,在碳电极上可以用伏安法检测到DNA发生的阳极氧化.其中采用的碳电极主要是热解石墨(PG)电极,还有玻碳(GC)电极^[1,3,4,7].在DPV图中,石墨电极上的DNA阳极氧化给出两个峰信号(中性体系中大约分别为0.9 V和1.2 V, vs. SCE).较负电位(0.9 V)的峰对应DNA中G碱基的氧化峰,较正电位(1.2 V)的峰对应DNA中A碱基的氧化峰^[1,4].

HOPG是一种具有棱面和解离表面的单晶石墨电极.由于具有平整的表面,HOPG常被用作SPM实验的基底.但是,HOPG很少用于DNA的电化学研究,到目前为止,文献上还没有关于HOPG上小牛胸腺DNA的氧化和吸附行为的报道.本文采用DPV和ECAFM分别对小牛胸腺双链DNA和单链DNA在HOPG电极上的氧化和吸附行为进行了研究.

DNA在电极上的现场紫外可见反射光谱的研究尚未见报道,本文采用玻碳电极探索了现场紫外可见反射光谱应用于DNA电化学研究的可能性,并发现紫外可见反射光谱在检测

本文 1998-12-09 收到; 国家自然科学基金资助项目(29803007)

* 通讯联系人

DNA 吸附方面具有比伏安法更高的灵敏度.

1 实验

电化学测试使用美国 EG&G PARC M273 恒电位仪和 Model 270 电化学分析软件. 电解池采用三电极体系, HOPG 或 GC 电极为工作电极, 铂丝为辅助电极, 参比电极 Ag/AgCl 和饱和甘汞电极. HOPG 电极为 Union Carbide Corporation 的产品, ZYH 级. 每次实验时用胶带纸将 HOPG 表面剥离, 得到新鲜的电极表面. GC 电极(纯度为 97.999%) 嵌在四聚氟乙烯棒中, 以铜棒与之连接, 表观面积为 0.0855 cm^2 .

ECAFM 实验在 NanoScope IIIa SPM 系统(Digital Instruments, Inc.) 上进行, 成像模式采用接触模式. 微悬臂为 Si_3N_4 , 长度 $200 \mu\text{m}$, 力常数为 0.12 N/m . 紫外可见反射光谱实验采用本课题组自行设计研制的紫外可见反射光谱仪^[9].

支持电解质为 0.1 mol/L 的 NaAC (pH 7.6) $1 \times \text{SSC}$ 缓冲液 (pH 7.0). 小牛胸腺 DNA 为华美 (Huame) 生物工程公司的产品 ($A_{260}/A_{280} = 1.86$), 使用时没有进一步纯化. 其他试剂均为分析纯. 溶液用三次蒸馏水配制. DNA 的热变性是把 DNA 加热到 100°C 约 15 min , 然后迅速地在冰浴中冷却. 实验时通 N_2 除 O_2 .

2 结果与讨论

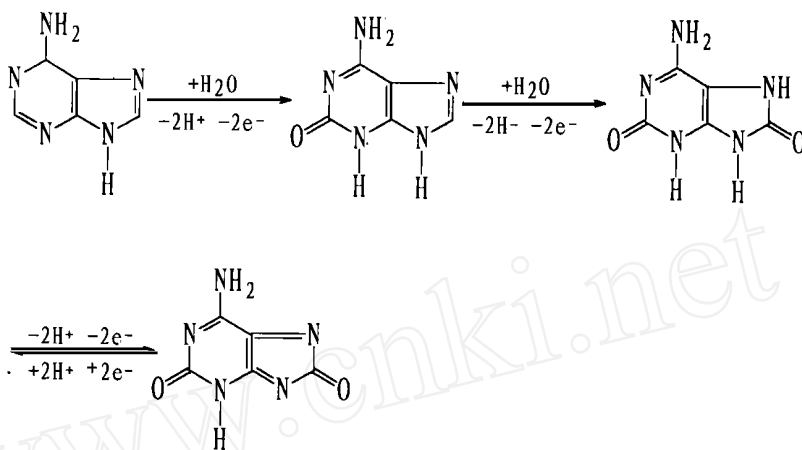
2.1 HOPG 电极上 DNA 的伏安法

在 DPV 实验中很难得到双链 DNA 在 HOPG 电极上氧化的信号. 而与此不同的是, 单链 DNA 能够给出明显的阳极氧化伏安峰(图 1). 在 DNA 的四种碱基中, 只有鸟嘌呤 (G) 碱基和腺嘌呤 (A) 碱基在石墨电极上能发生氧化, 给出相应的伏安峰^[1]. 其阳极氧化相对以下反应:

图 1 单链 DNA 的微分脉冲伏安图

Fig. 1 Differential pulse voltammogram of ssDNA (278 mg/dm^3), 0.1 mmol/L NaAC buffer, pH 7.6. Pulse amplitude 20 mV , pulse width 60 ms

鸟嘌呤碱基氧化反应途径



腺嘌呤碱基氧化反应途径

A 碱基和 G 碱基的主要氧化位点不参与构成 DNA 双螺旋结构的氢键且靠近 DNA 分子的表面,原则上,无论是双链 DNA 还是单链 DNA,这些氧化位点均可发生反应.两者的区别主要是在于,两种 DNA 的柔韧性不同,以及它们同电极表面的接触程度不同.因为我们所采用的 HOPG 电极为平整的单晶表面,比起普通的石墨电极,HOPG 电极表面与 DNA 分子应该有更多的接触.但是,DNA 分子的柔韧性对于其在电极表面的吸附仍然起着主要作用.相对比较刚性的双链 DNA,其 G、A 碱基在电极表面的浓度很小,以至于不能给出明显的阳极氧化的伏安信号,而比较柔性的单链 DNA,其 G、A 碱基可以在电极表面吸附到足够高的浓度,给出明显的阳极氧化伏安信号.

图 2 双链 DNA 的微分脉冲伏安图
 Fig. 2 Differential pulse voltammogram of dsDNA
 a) pre-polarized at 0.4 V for 15 min b) no polarization, other conditions as Fig. 1

图 3 单链 DNA 的微分脉冲伏安图
 Fig. 3 Differential pulse voltammogram of ssDNA
 a) no pre-polarization b) pre-polarized at 0.4 v for 15 min, other conditions as Fig. 1

经过一定预极化处理(例如在 0.3 V vs. Ag/AgCl 下预极化 15 min)的双链 DNA 在 DPV 图上可以给出阳极氧化峰(图 2). 而单链 DNA 经过预极化和未预极化处理,两者差别不大(图 3). 这个现象可能是由于两种 DNA 在电极表面的吸附形式不同所致. 双链 DNA 是通过磷酸-核糖骨架与 HOPG 电极表面作用,主要通过静电力吸附,在正电位下极化有利于吸附. 而单链 DNA 上的暴露出来的碱基也可以同电极表面发生作用,吸附可以通过化学键合、静电力等多种作用,因此单链 DNA 本来就具有较强的吸附,因而电场对其吸附影响不明显.

双链 DNA 的伏安峰(经预极化处理)仅在第一循环时出现,第二循环后峰迅速降低,直至消失. 而单链 DNA 的伏安峰则可以多次重复的出现. 可见双链 DNA 的氧化产物在电极表面的吸附较强,阻止了溶液中的 DNA 分子继续往电极表面吸附.

实验中,除了两个正常的氧化峰外(分别对应于 DNA 上 G、A 碱基的氧化),在较负的电位也出现了一个氧化峰,峰的位置表明可能是溶液中自由 G 碱基所给出的氧化峰^[4,10].

Brabec 等 PG 电极上所得到的 DNA 中 G、A 碱基的氧化峰电位与 Yao, Brett 等在 GC 电极上所得到的峰电位有所不同,他们认为这是由于 DNA 溶液存在不同程度的降解所导致的^[4,7]. 我们在实验中所得到的氧化峰电位与他们得到的电位也存在一定差别. 我们认为除了降解的因素外,还可能与不同类型碳电极的表面结构和性质有关.

2.2 HOPG 电极上 DNA 的 ECAFM

HOPG 电极与 AFM 和 STM 等 SPM 技术相结合^[11,12]有助于将 DNA 的电化学研究进一步扩展到分子原子水平. 在本工作中选用 ECAFM 技术,因为 AFM 中针尖不会产生局部电

图 4 双链 DNA 的 ECAFM 图

Fig. 4 ECAFM images of dsDNA at a concentration of 0.3 g/dm³, SSC buffer, pH7.0

NanoScope	EC Contact AFM
Scan size	4.000 μm
Setpoint	- 1.975 V
Scan rate	3.052 Hz
Number of samples	256
Data type	Height
Z range	19.51 nm

图 5 双链 DNA 的 ECAFM 图

Fig. 5 ECAFM images of dsDNA, several min. later than Fig. 4

NanoScope	EC Contact AFM
Scan size	4.000 μm
Setpoint	- 1.975 V
Scan rate	3.052 Hz
Number of samples	256
Data type	Height
Z range	19.51 nm

场,比 STM 更适合于研究电场作用对于 DNA 构形构象的影响.

已有文献^[13]认为,大分子量的 DNA 分子难以平躺地吸附在电极表面. 吸附在 HOPG 电极上的双链 CT DNA 的 ECAFM 图象(图 4)表明,双链 DNA 分子的部分片段吸附于电极表面,未直接吸附于电极表面的 DNA 分子链片段形成了图中所见到的 DNA“岛”. 由于针尖的作用,经过一段时间的扫描后,DNA“岛”的分布将发生变化(图 5). DNA“岛”侧面的阴影为扫描过突出的“岛”状结构后针尖突然下降所形成的. 实验中,在 +0.4 ~ -0.6 V (vs. Ag/AgCl) 的电位区间内进行电位扫描, ECAFM 的图象没有发生变化,说明在此电位区间内, ECAFM 观测不到双链 CT DNA 的解链行为,或许在这电位区间内 CT DNA 尚未发生解链. 将 DNA 溶液稀释十倍后,可以观测到基底的石墨结构(图 6)表明此时吸附的 DNA 分子在电极表面没有铺满.

图 6 双链 DNA 的 ECAFM 图(稀释十倍后)
Fig. 6 ECAFM images of dsDNA at a concentration of 0.03 g/dm³, SSC buffer, pH7.0

NanoScope	EC Contact AFM
Scan size	6.000 μm
Setpoint	- 2.950 V
Scan rate	3.014 Hz
Number of samples	256
Data type	Height
Z range	23.55 nm

2.3 DNA 在玻碳电极上的 现场紫外可见反射光谱

先将处理好的玻碳电极浸入 DNA 溶液中大约 12 h, 然后进行光谱实验, 测量相对反射率

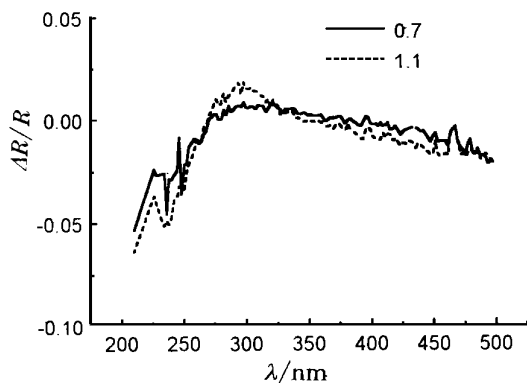


图 7 玻碳电极空白体系的紫外反射光谱;以下 UV 实验图的 DNA 浓度均为 300 mg/L, pH 7.4, 0.1 mol/L NaAC 缓冲溶液
Fig. 7 UV/Vis reflection spectroscopy of supporting electrolyte on GCE

图 8 玻碳电极上双链 DNA 的紫外可见反射光谱
Fig. 8 UV/Vis reflection spectroscopy of dsDNA on GCE

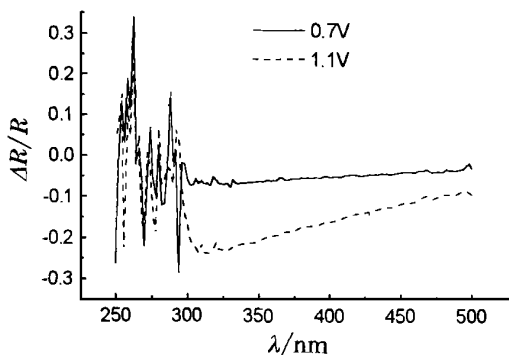


图 9 玻碳电极上单链 DNA 的紫外可见反射光谱
Fig. 9 UV/Vis reflection spectroscopy of ssDNA on GCE

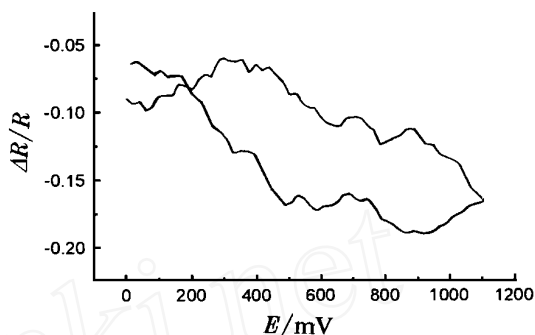


图 10 玻碳电极上 dsDNA 的 $R/R \sim E$ 关系图
 $\lambda = 350 \text{ nm}$
Fig. 10 Relative reflectance change curve as the function of potential for dsDNA

变化 ($R/R = (R(E_w) - R(E_0)) / R(E_0)$), 其负值 ($-R/R$) 表示吸附 DNA 的对光的吸收, 参考电位 E_0 为 0.3 V (vs. SCE), 实验电位 E_w 分别为 0.7 V 和 1.1 V (vs. SCE), 在 200 ~ 300 nm 处因光源信号较弱, 信噪比较差. 图 7, 8, 9 分别是不含 DNA 的空白体系, 含双链 DNA 的体系和含单链 DNA 的体系的紫外可见反射光谱, 图 10, 11 分别是相对反射率变化与电位的关系图.

单链 DNA 在玻碳电极的紫外可见反射光谱图 (图 9) 表明, DNA 及氧化产物可以吸附在电极上, 吸收峰在约 325 nm 处; 相对反射率在大约 0.5 V 和 0.9 V (vs. SCE) 处明显下降 (图 11), 这同伏安图上氧化峰电位一致.

在伏安图中难以给出双链 DNA 的阳极氧化峰. 但是, 从双链 DNA 在玻碳电极上的谱图 (图 8) 和相对反射率对电位的依赖性 (图 10) 可见, 除了吸收的强度不如单链 DNA 以外, 在玻碳电极上双链 DNA 具有和单链 DNA 类似的性质, 可以吸附在电极表面并发生氧化反应.

实验测得的吸收峰在 325 nm 处, 比在溶液中的 DNA 吸收峰 260 nm 红移约 65 nm, 红移的原因可能是由于 DNA 氧化引起的.

3 结 论

实验说明, HOPG 电极不仅适合于 DNA 的伏安法研究, 也可以用于在原子分子水平对

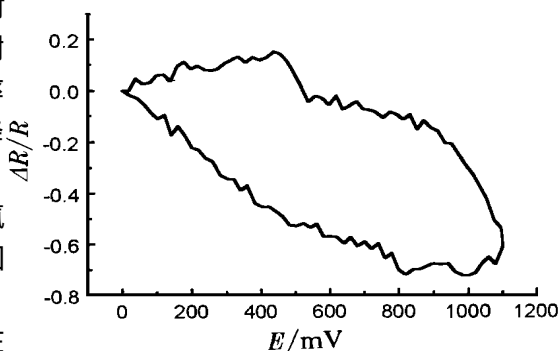


图 11 玻碳电极上 ssDNA 的 $R/R \sim E$ 关系图
 $\lambda = 350 \text{ nm}$
Fig. 11 Relative reflectance change curve as the function of potential for ssDNA

DNA 在电极表面的吸附和构向进一步研究. 在电极表面上双链 DNA 的吸附很大程度上取决于控电位预极化, 而单链 DNA 的吸附则与预极化关系不大. HOPG 电极上的 ECAFM 方法在 DNA 研究方面有很宽阔的应用前景. 紫外可见反射光谱在研究 DNA 的吸附时具有比伏安法更高的灵敏度.

致谢: 感谢毛秉伟教授在 AFM 实验中的大力帮助.

Oxidation and Adsorption of Deoxyribonucleic Acid at Highly Ordered Pyrolytic Graphite and Glass Carbon Electrode

Zhou Jianzhang Wu Lingling Luo Jin Lin Zhonghua *

(*State Key Lab. for Phys. Chem. of the Solid Surf., Dept. of Chem., Inst. of Phys. Chem., Xiamen Univ., Xiamen 361005*)

Abstract It is shown that calf thymus DNA (CT DNA) can be adsorbed at highly ordered pyrolytic graphite (HOPG) electrode and detected by differential pulse voltammetry (DPV) and electrochemical atomic force microscopy (ECAFM). It is found that controlled potential pre-polarization influences largely the adsorption of dsDNA while it has little influence on ssDNA. It is demonstrated that ECAFM is useful to exploit adsorption of DNA at HOPGE. The pattern of adsorption of DNA at HOPG electrode that fits best with the experimental data is proposed. The results also shows that UV/Vis reflection spectroscopy, which has not been used in studying electrochemical behavior of DNA, is more sensitive than voltammetry in the investigation of DNA adsorption.

Key words DNA, HOPG, Pre-polarization, Oxidation, ECAFM, UV/Vis reflection spectroscopy

References

- 1 Brabec V, Dryhurst G. Electrochemical behaviour of natural and biosynthetic polynucleotides at the pyrolytic graphite electrode: A new probe for studies of polynucleotide structure and reactions. *J. Electroanal. Chem.*, 1978, 89:161; Brabec V, Electrochemical oxidation of polyadenylic acid at graphite electrodes. *J. Electroanal. Chem.*, 1978, 91:219

- 2 Wu J T et al. Electrochemical behaviours of DNA at mercury film electrode. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 1997, 44:151
- 3 Yao T et al. The anodic voltammetry of deoxyribonucleic acid at a glassy carbon electrode. *Bull. Chem. Soc. Japan*, 1978, 51:1 235
- 4 Brabec V, Koudelka J. 314-electrochemical oxidation of nucleic acids and proteins at graphite electrode: Qualitative aspects. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 1980, 7:69; Brabec V, Koudelka J, 394-Oxidation of deoxyribonucleic acid at carbon electrodes: The effect of the quality of the deoxyribonucleic acid sample. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 1980, 7:793
- 5 Pang D W et al. Modification of glassy carbon and gold electrodes with DNA. *J. Electroanal. Chem.*, 1996, 403:183
- 6 Brabec V. 133-nucleic acid analysis by voltammetry at carbon electrodes. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 1981, 8:437
- 7 Brett C M A et al. On the adsorption and electrochemical oxidation of DNA at glassy carbon electrodes. *J. Electroanal. Chem.*, 1994, 366:225
- 8 Palecek E et al. Biopolymer-modified electrodes in the voltammetric determination of nucleic acids and proteins at the submicrogram level. *Anal. Chimica Acta*, 1993, 273:175
- 9 Luo J et al. In situ electronic spectroscopic techniques for interfacial electrochemistry. *Chem. Res. Chinese Univ.*, 1996, 12:270
- 10 Gyal R N, Dryhurst G. Redox chemistry of guanine and 8-oxyguanine and a comparison of the peroxidase-catalyzed and electrochemical oxidation of 8-oxyguanine. *J. Electroanal. Chem.*, 1982, 135:75
- 11 Engel A. Biological applications of scanning probe microscopes. *Annu. Rev. Biophys. Chem.*, 1991, 20:79
- 12 Bloomfield V A, Arscott P G. *Nucleic Acids and Molecular Biology*. Eckstein F, Liley D M J (eds.), Springer, Berlin, Heidelberg, 1991, 5:39
- 13 Malfroy B, Reynaud J A. Electrochemical Investigation of Nucleic Acid Behaviour Part I. Native Calf Thymus DNA. *J. Electroanal. Chem.*, 1976, 67:59