

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 焯, 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<sup>[1-4]</sup>. 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<sup>[5,6]</sup>. 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<sup>[7]</sup>. 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), 硫基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, pH7.3) 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 $\alpha$  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  $\Omega$ ) 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 3.5  $\mu$ , 1.5  $\mu$ , 0.5  $\mu$  和 0.05  $\mu$  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

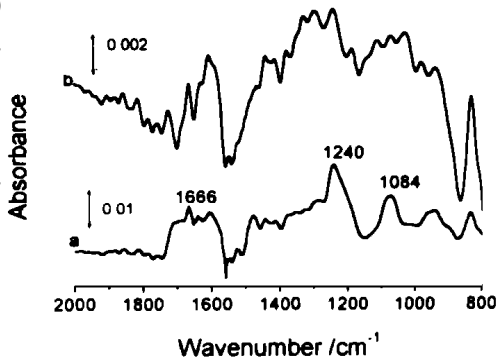


图 1 dsDNA/PDDA/Au (a) 和 ssDNA/PDDA/Au 的红外漫反射谱图

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

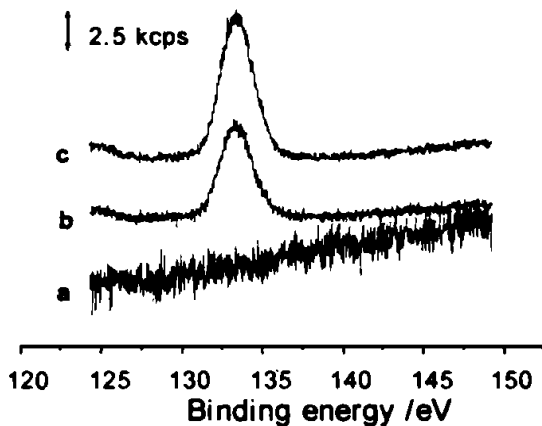


图 2 PDDA (a), dsDNA/PDDA (b) 和 ssDNA/PDDA (c) 在金上的 XPS P<sub>2p</sub> 谱图

Fig. 2 The P<sub>2p</sub> 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),  $100 \times 100$  nm, current mode, Z-range: 0.58 nm, setpoint: 0.88 nA, V bias: 0.20 V



图 3b DNA/PDDA 的 STM 图象

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

动,  $1666\text{ cm}^{-1}$  处的峰则对应于 DNA 碱基中双键的伸缩振动<sup>[9]</sup>. 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<sup>[10]</sup>.

## 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  $v$  成正比, 而在 ssDNA/PDDA/Au 电极上  $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+/2+}$  的  $I_{pa}$  与  $v^{1/2}$  或  $v$  均不成正比. 这说明对 dsDNA/PDDA/Au 电极

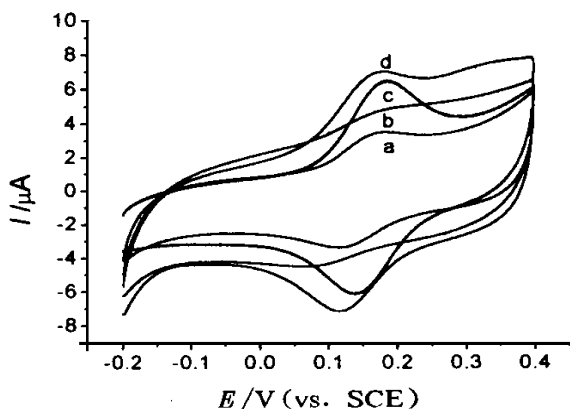


图4  $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+/2+}$  在不同电极上的循环伏安图

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

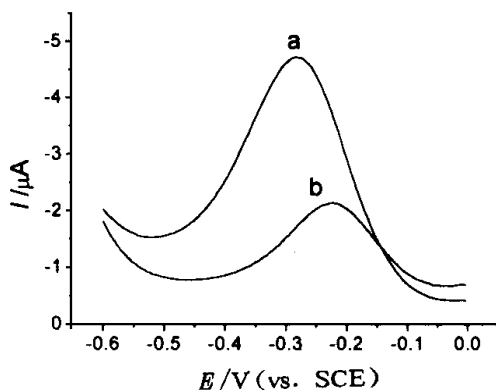


图5 吸附硫堇在 DNA/PDDA 电极上的微分脉冲伏安图

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<sup>[11]</sup>,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, Csiki A, Kähler J M, et al. Chip-based optical detection at DNA hybridization by means of nanobead labeling[J]. *Anal. Chem.*, 2000, 72: 6 025.
- [5] Lipshutz 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 10<sup>th</sup> 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.