

脱氧核糖核酸在 汞膜电极上的电化学行为

吴金添 周剑章 黄寅 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 首次在汞膜电极上利用循环伏安、微分脉冲和交流伏安法研究脱氧核糖核酸(DNA)的电化学行为。结果表明汞膜电极作为一类固体电极可应用于负电位区 DNA 电化学行为的研究。同时结合凝胶电泳和 UV 光谱法, 研究了用纯高氯酸处理的 DNA 的氧化还原特性, 结果表明纯高氯酸可引起 DNA 的变性和降解。纯高氯酸不适宜用于 DNA 的变性处理。

关键词 脱氧核糖核酸, 汞膜电极, 高氯酸

1 引言

DNA 的电化学行为具有重要的理论与实际意义。目前它的氧化是利用碳、金等固体电极在比较正的电位进行, 其还原是利用滴汞电极(DME)或悬汞电极(HMDE)一类的液态汞电极在相当负的电位进行^[1-6]。作为 DNA 电化学传感器, 均采用的是固体电极^[7,8]。若要利用 DNA 还原作为电化学传感器的信号或在分子水平上研究其还原过程, 那么较难采用液态汞电极。因此寻找一种合适的固体电极以便在负电位区研究 DNA 的还原行为仍是一个亟待解决的问题。本文以银基汞膜电极(SBMFE)代替一般的滴汞电极(DME)或悬汞电极(HMDE), 研究 DNA 在负电位区的电化学行为^[9,10]。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

电化学测试使用美国 EG&PARC M273 恒电位仪和 Model 270 电化学分析软件。UV 光谱使用日本岛津 UV-240 分光光度计测量。电解池采用三电极体系, 汞膜电极为工作电极, 铂丝为辅助电极, 饱和甘汞电极(SCE)为参比电极。实验测得的电位均相对于饱和甘汞电极。所有实验都在室温完成。实验时通 N₂ 除 O₂。

小牛胸腺 DNA ($A_{260}/A_{280} = 1.86$) 为华美(Huame)生物工程公司产品, 使用时没有进一步纯化。其他试剂均为分析纯。溶液用二次蒸馏水配制。用甲酸铵调节所使用的 Mc IL vaine 缓冲液(55.4 g/L Na₂HPO₄ + 4.79 g/L 柠檬酸 + 3.59 g/L NH₄F) pH = 6.8。

2.2 DNA 变性处理

DNA 按下列步骤进行热变性处理: 先将 DNA 加热到 100℃ 约 15 min, 然后迅速地在冰浴中冷却。DNA 按下列步骤用纯高氯酸处理^[11]: 首先准确称取约 7.5 mg 样品, 用 1 mL 高氯酸处理 15 min, 然后用 1 mL 的 9 mol/L 的 NaOH 溶液中和, 溶液随后滴加 23 mL 的适当的缓冲溶液至最后体积为 25 mL。

2.3 汞膜电极的制备

1997-07-02 收稿; 1998-03-10 接受。

本文系国家教委和国家自然科学基金资助课题。

选用银丝(纯度 99.9%, $\Phi 300$ mm, the British Drug Houses 产品)作为汞膜电极的基体。在未加搅拌的 0.1 mol/L $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ ($\text{pH} = 2$) 溶液中, 电位控制在 0.2 V 电沉积汞。为了改进它的电化学性能, 可将汞膜电极在 1.0 mol/L NaOH 溶液中控制电位在 -2.5 V 下极化几秒钟进行预处理。另外, 我们发现在已老化的汞膜电极上电沉积汞, 这样制备的汞膜电极具有较好的性能。因此, 在我们的实验中, 使用的都是经过二次或者二次以上电沉积后的汞膜电极。

汞膜电极存放在蒸馏水中, 在老化的汞膜电极上电沉积 1 μm 厚汞层的银基汞膜电极 (SBMFE), 可持续使用 48 h。

3 结果与讨论

3.1 汞膜电极上 DNA 在负电位区的电化行为

天然 DNA 和热变性 DNA 的还原的微分脉冲伏安图示于图 1。由图可见, 在实验扫描电位范围内, 天然 DNA 没有给出任何信号, 热变性 DNA 在 -1.4 V 附近较易在 SBMFE 上还原。热变性 DNA 经第一个循环还原后, 从第二个循环开始没有给出伏安信号, 说明强吸附在电极表面的变性 DNA 还原产物抑制了 DNA 的进一步还原。DNA 的 4 种核苷的微分脉冲伏安图示于图 2。很明显, 热变性 DNA 的还原峰对应于腺嘌呤 (A) 和胞嘧啶 (C) 残基的还原, 这与利用 DME 和 HMDE 测得的结果是一致的⁽¹⁻⁶⁾。

交流实验(交流伏安和交流阻抗)没有给出 DNA(天然和变性)在电极表面上吸附的迹象。DNA 在汞膜电极上难于吸附, 这一行为与滴汞电极上的吸附大为不同, 文献上报道^(1,2,5,6), 只要将 HMDE 插入含有 DNA 的溶液中, DNA 便吸附在 HMDE 表面, 这反映液汞电极和汞膜电极之间的差别。DME 或 HMDE 表面较易变形, 而作为固态电极的 SBMFE 的表面汞层比较刚性, 因此在液汞电极上的 DNA 链与电极表面会有比较多的接触, 有利于 DNA 分子在液汞电极表面的吸附。

3.2 用纯高氯酸处理 DNA

有许多方法可以引起 DNA 的变性, 例如: 热变性, 酸变性等。Brett 等使用了高氯酸变性 DNA 并研究了其在玻碳电极上的氧化行为⁽¹¹⁾。他们和我们的实验结果表明, 除了用高氯酸处理的 DNA 氧化时电流比较大外, 两者的氧化行为差别不大。

这里, 我们比较详细地研究了用纯高氯酸处理的 DNA 的性质, 发现了一些不寻常的现象。

3.2.1 非电化学方法 当 DNA 用高氯酸处理到足够长的时间, 产生一种褐色的沉淀物。用高氯酸处理胸苷时发现同样颜色的沉淀物, 腺苷、胞苷和鸟苷没有这一现象。用凝胶电泳检测 DNA 的分子量, 发现热变性 DNA 和天然 DNA 有一窄的泳带。在 260 nm 波长, UV 光谱吸收顺

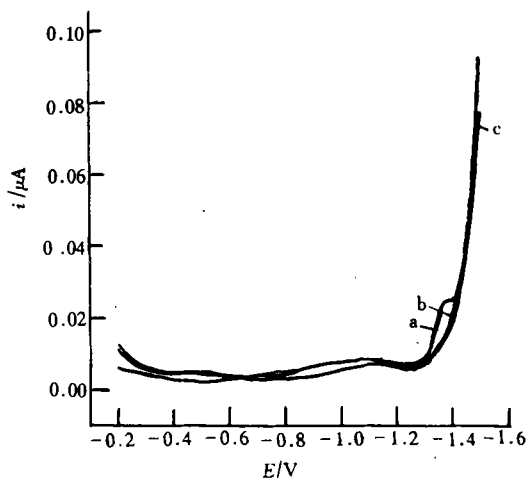


图 1 天然和热变性小牛胸腺 DNA 的还原的微分脉冲伏安图

Fig. 1 Differential pulse voltammogram of native and denatured calf thymus deoxyribonucleic acid (DNA)

(a) 变性 DNA 的第一循环 (the first cycle of denatured DNA at a concentration of 300 mg/L); (b) 变性 DNA 的第二循环 (the second cycle of (a)); (c) 天然 (native) DNA (at a concentration of 300 mg/L). Mc Ilvaine 缓冲溶液 (buffer) (b 曲线与 c 重合) (curve b is same as curve c).

序如下:用高氯酸处理的 DNA > 热变性 DNA > 天然的 DNA。这些结果表明 DNA 链被高氯酸降解成小分子, DNA 中的碱基对间的氢键遭到比热变性 DNA 更多的破坏, 导致电泳实验溴乙锭(EB)无法显示和 UV 吸收光谱的增色效应。

3.2.2 电化学方法 用纯高氯酸处理的 DNA 的循环伏安图示于图 3。与热变性 DNA 和天然 DNA 不同, 伏安图上 A、C 还原峰消失了, 而在电位 -0.5 V 和 -1.1 V 附近出现二对附加的氧化还原峰(实验已证实它不是高氯酸的氧化还原峰)。这可能因 DNA 中 A、C 残基被高氯酸破坏的产物给出伏安峰, 并且该氧化还原反应具有某种程度的可逆性。更有趣的是我们发现用高氯酸处理的 DNA 很容易吸附在电极表面上, 仅仅把电极插入含有高氯酸处理的 DNA 溶液中吸附便发生了, 这一特征易用吸附转移溶出伏安法(AdTSV)检测到^[5]。我们还发现用高氯酸处理的 DNA 能影响氢在 SBMFE 上的析出反应, 大量氢析出之前在 -1.8 V 附近出现了一个相当大的电流峰(图 4)。因为电流如此大, 不可能是 DNA

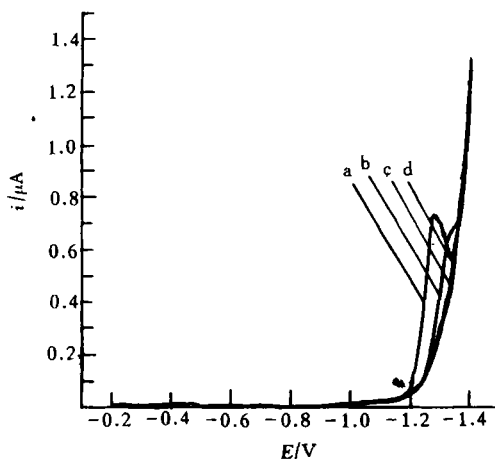


图 2 DNA 的 4 种核苷的微分伏安图
Fig.2 Differential pulse voltammogram of four nucleosides

a. 腺苷 (adenosine); b. 胞苷 (cytidine); c. 鸟苷 (guanosine); d. 胸苷 (thymidine)。浓度 (concentration): 0.1 mmol/L, 扫描速度 (scan rate): 100 mV/s, 磷酸缓冲溶液 (phosphate buffer solution)。

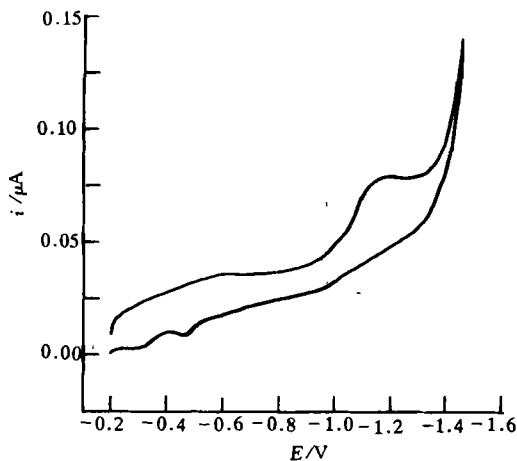


图 3 在银基汞膜电极上用纯高氯酸处理的 DNA 的循环伏安图

Fig. 3 Conventional cyclic voltammogram of DNA treated by pure HClO₄ at silver base mercury film electrode

浓度 (concentration): 300 mg/L; 扫描速度 (scan rate): 100 mV/s; 磷酸缓冲溶液 (phosphate buffer solution)。

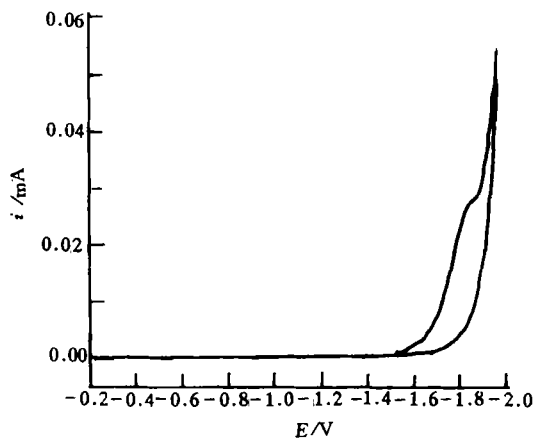


图 4 用纯高氯酸处理的 DNA 的循环伏安图 (析氢)

Fig. 4 Conventional cyclic voltammogram of DNA treated by pure HClO₄, showing the catalytic hydrogen evolution in phosphate buffer

降解产物本身的反应峰, 我们认为它也是析氢峰。该析氢机理可能是吸附的 DNA 降解产物中的碱基与 H⁺ 形成加合物, 该加合物中的 H⁺ 较易还原成氢分子。这二个结果进一步表明, 高氯酸使 DNA 发生降解等变化, 处理后产物分子比较小, 比 DNA 分子容易在 SBMFE 上吸附^[12]。

4 结 论

实验结果表明:(1)汞膜电极作为一类固体电极可应用于负电位区 DNA 电化学反应的研究;(2)DNA 在汞膜电极上的阴极还原行为与液态汞电极相同,但 DNA 难于在汞膜电极上吸附;(3)尽管在碳电极上经纯高氯酸变性和热变性的 DNA 有类似的阳极氧化行为,但在汞膜电极上,经纯高氯酸变性的 DNA 的 A、C 还原峰消失,而在比 A、C 还原峰较正的电位出现二对氧化还原峰,说明纯高氯酸处理引起 DNA 变性、降解,且 A、C 残基被破坏成其他小分子,DNA 降解产物易吸附在汞膜电极上,并对析氢有催化作用。

致 谢 本课题电泳实验在厦门大学生物系细胞生物学研究室完成,并承蒙陈元霖副教授和桂慕兰实验师的亲切指导和大力协作,谨此表示诚挚的谢意。

参 考 文 献

- 1 Palecek E. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 1981, 8:469
- 2 Dryhurst G. *Electrochemistry of Biological Molecules*. Academic Press, 1977: Chap.5
- 3 Palecek E. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 1986, 15:275
- 4 Palecek E. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 1988, 20:179
- 5 Palecek E. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 1992, 28:71
- 6 Berg H. in *Comprehensive Treatise of Electrochemistry*. Ed. by Srinivasan S, Chizmadzhev Y A, Conway B E, Bockris J O'M, Yeager E. Vol. 10, Plenum Press, 1985: 203
- 7 Millan K M, Mikkelsen S R. *Anal. Chem.*, 1993, 65:2317
- 8 Palecek E, Jelen F, Teijeiro C, Fucik V, Jorin T M. *Anal. Chim. Acta.*, 1993, 273:175
- 9 Toshida Z. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1981, 54:562
- 10 Stojek Z, Kublik Z. *J. Electroanal. Chem.*, 1975, 60:349
- 11 Brett M A C, Brett A M O. *J. Electroanal. Chem.*, 1994, 366:225
- 12 Janik B, Elving P J. *Chem. Rev.*, 1968, 68:295

Electrochemical Behaviors of Dioxiribonucleic Acid at Mercury Film Electrode

Wu Jintian, Zhou Jianzhang, Huang Yin, Luo Jin, Lin Zhonghua*

(State Key Laboratory for Physical Chemistry of Solid Surfaces, Department of Chemistry,
Institute of Physical Chemistry, Xiamen University, Xiamen 361005)

Abstract DNA was studied by means of cyclic voltammetry (CV) with a mercury film electrode (MFE) using conventional CV, differential pulse voltammetry and alternating current voltammetry. The MFE is sufficiently stable and can be used to study electrochemical behaviors of DNA in the negative potential region. This means that MFE is ready to be one kind of solid electrode at which more useful electrochemical techniques can be carried out, such as spectroelectrochemical techniques. Redox character of DNA treated by pure HClO₄ was studied at MFE. It seems that pure HClO₄ would not only bring about the denaturation of DNA but the degradation of it. Pure HClO₄ is not suitable for performing the denaturation of DNA.

Keywords Dioxiribonucleic acid, mercury film electrode, perchloric acid

(Received 2 July 1997; accepted 10 March 1998)