

学校编号：10384

分类号：\_\_\_\_\_

密级：\_\_\_\_\_

学 号：B9825011

U D C：\_\_\_\_\_

厦门大学理学博士学位论文

# 分子自组装固定 DNA 和 DNA 与其他分子的 相互作用及应用

**周剑章**指导教师 **林仲华** 教授 厦门大学化学系**吴玲玲** 博士 厦门大学化学系申请学位级别 博 士 专业名称 物理化学论文提交日期 2001.11 论文答辩日期 2001.11学位授予单位 厦门大学答辩委员会主席 黄金陵 教授论文评阅人 黄金陵 教授、江志裕 教授、苏方腾 教授  
苏文煨 教授、陈衍珍 教授

2001 年 11 月

**Immobilization of DNA using self-assembly and  
interaction of DNA with other molecules as well as  
its applications**

A Dissertation Submitted for the Degree of Doctor

Philosophy

By

**Jian-Zhang ZHOU**

This work was carried out under the supervision of

**Professor Zhong-Hua LIN**

**Doctor Ling-Ling WU**

At

Department of Chemistry, Xiamen University

November, 2001

# 目 录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	IV
第一章 绪论.....	1
§ 1.1 DNA 电化学研究的意义.....	1
§ 1.2 DNA 与其他分子相互作用的研究.....	3
§ 1.2.1 DNA 与其他分子的相互作用研究的意义.....	3
§ 1.2.2 DNA 同其他分子的相互作用研究与药物设计.....	4
§ 1.2.3 与 DNA 相互作用的其他分子的分类.....	6
§ 1.2.4 DNA 与其他分子相互作用的模式.....	15
§ 1.3 DNA 的导电性.....	17
§ 1.4 DNA 研究常用的表征方法.....	21
§ 1.5 基因检测和基因 (DNA) 传感器检测技术.....	29
§ 1.5.1 基因检测.....	29
§ 1.5.2 基因传感器的工作原理.....	30
§ 1.5.3 基因传感器的分类.....	30
§ 1.5.4 基因传感器的新进展：肽核酸用于 DNA 检测的识别层.....	35
§ 1.6 基因芯片.....	37
§ 1.7 DNA 传感器与 DNA 损伤的研究.....	38
§ 1.8 DNA 固定化的意义.....	40
§ 1.9 论文设想和主要工作.....	41
参考文献.....	42
本章图表.....	49

第二章 实验.....	53
§ 2.1 试剂.....	53
§ 2.2 电极制备.....	54
§ 2.3 仪器.....	55
参考文献.....	56
第三章 DNA 的固定化及表征.....	57
§ 3.1 固定化方法分类.....	57
§ 3.2 应用于DNA研究的自组装技术.....	61
§ 3.3 PDDA 分子自组装固定 DNA 及表征.....	63
§ 3.3.1 PDDA 分子自组装固定 DNA.....	63
§ 3.3.2 PDDA 自组装固定 DNA 的表征.....	66
§ 3.4 PEI 分子自组装固定化 DNA 及表征.....	74
§ 3.5 氧化铝模板法固定化 DNA.....	77
§ 3.6 小结.....	80
参考文献.....	81
本章图表.....	84
第四章 DNA 与其他分子的相互作用及 DNA 杂交的电化学标 记.....	113
§ 4.1 前言.....	113
§ 4.2 DNA 杂交的电化学标记.....	113
§ 4.3 DNA 与 $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+/2+}$ 的相互作用和电化学标记.....	114
§ 4.4 关于杂交标记物的选择.....	116
§ 4.5 MB 作为电化学标记物的研究及其与 DNA 的相互作用... ..	117
§ 4.6 巯基作为电化学标记物的研究.....	120
§ 4.7 小结.....	122

参考文献.....	123
本章图表.....	124
第五章 MB 在自组装膜上的电极反应和自组装膜的电子传递性能.....	129
§ 5.1 前言.....	129
§ 5.2 PDDA 自组装膜的电子传递性能.....	130
§ 5.3 固定化 DNA 的 PDDA 自组装膜的电子传递性能.....	133
§ 5.4 MB 在 PEI 自组装膜及固定化 DNA 后电极上的电子传递性能.....	136
§ 5.5 小结.....	138
参考文献.....	138
本章图表.....	139
攻读博士期间发表和交流的论文.....	158
致谢	

厦门大学博硕士学位论文摘要

## 摘 要

随着人类基因组计划 (HGP) 的顺利实施, 人类基因组的工作草图提前绘制成功, 人类在生命科学领域的认知又前进了一大步。然而在知道基因图谱之后, 接下来的问题是面对大量的基因或基因片断序列如何研究其功能, 研究重点便是要搞清楚基因变体的生物学功能及其对生命、健康和疾病的意义。各种重大疾病的易感基因以及这些基因之间的相互作用关系, 将是研究的重中之重。因而对 DNA 与其他分子相互作用的基础研究变得越来越重要。另一方面, 利用基因检测来进行基因诊断和基因治疗迫切需要研制开发各种适用于不同使用环境下的或快速灵敏或高密度高通量或方便廉价的基因传感器、基因芯片。

要构筑基因传感器、基因芯片 (包括光学、电化学和压电传感器或芯片), 首先必须先将与待测的靶分子碱基序列互补的 DNA 探针固定到固体表面上, 构筑一个 DNA 识别层 (DNA recognition layer), 然后才能进一步进行根据碱基互补原理通过杂交反应检测其互补片段。DNA 探针的固定化是制备基因传感器 (芯片) 的主要内容之一。

在本论文工作中, 我们提出了使用自组装的聚二烯丙基二甲基氯化胺 (PDPA) 单层膜来固定 DNA 的新办法, 用 XPS、红外漫反射、拉曼和 STM 技术进行了表征。XPS、红外漫反射光谱、拉曼光谱、STM 和电化学实验均表明 DNA 可以成功固定化到 PDPA 自组装膜上。STM 图像还表明单晶金电极上 PDPA 自组装膜是呈二维有序的线条状分布, 随后吸附的 DNA 可顺着该结构进行固定化, 也具有一定的有序性。该固定化 DNA 的方法不仅可以用于制备用于电化学 DNA 传感器, 同样也适用于其他类型的 DNA 传感器。由于 PDPA 自组装单层膜具有的一定的纳米有序性, 使得其不仅可以用于制备 DNA 传感器, 还有可能进一步用于开发高

密度高通量的 DNA 芯片。

我们还首先尝试了在金电极上用直接吸附的办法形成聚乙烯亚胺 (PEI) 自组装单层,并将其用于 DNA 的固定化。XPS、红外漫反射和拉曼光谱实验均证明了 PEI 在金电极上的自组装,以及 DNA 在 PEI 自组装膜上的吸附。STM 图像表明了 PEI 自组装膜是个表面具有多孔洞的结构。

通过对两种聚电解质自组装膜固定化 DNA 的比较,我们发现 PEI 自组装膜虽然也不失为一种可行的 DNA 固定化方法,可应用于 DNA 传感器的制备和 DNA 电化学研究,但是,相对而言,PDDA 自组装单层膜具有电子传递性能更好、表面更加有序的优点。

在研究聚电解质自组装固定化 DNA 技术的同时,我们还提出一种新的采用氧化铝模板构筑高密度 DNA 阵列的方法,并用 XPS、红外漫反射、拉曼和 AFM 技术进行了初步的表征。

我们应用 PDDA 自组装膜电极研究钴邻菲咯啉配合物  $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+/2+}$  与电极上吸附的 DNA 相互作用,分析了  $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+/2+}$  与电极上修饰的 dsDNA 和 ssDNA 不同的相互作用模式,同文献的结果相符合。说明可以使用 PDDA 自组装膜电极来研究 DNA 与其他分子相互作用的电化学行为。根据  $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+/2+}$  与 dsDNA 和 ssDNA 由于不同的相互作用模式,而出现的不同电化学行为,我们提出一种用以表征 DNA 分子杂交的电化学标记法,例如控制合适的电位,通过杂交前后电流的明显变化与否来判断杂交与否,电化学标记法提供了一种 DNA 传感器或芯片电读出的方法。实验结果也表明,采用氧化还原电对  $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+/2+}$  作为标记物种,PDDA 自组装膜电极可以用于制备电化学标记的 DNA 杂交传感器。

我们还采用 PDDA 和 PEI 自组装膜电极考察了两种染料分子硫堇和亚甲基蓝 (MB) 作为电化学标记物的可行性。线性扫描伏安图中,MB 在 dsDNA 和 ssDNA 修饰电极上给出的阴极电流峰具有显著的差异;微分脉冲伏安图

中，硫堇同杂交前后的 DNA 相互作用后所给出的阴极电流峰有明显区别。结果表明，两种染料分子均可作为标记物构筑 DNA 电化学传感器。我们还通过电化学方法和拉曼光谱对 MB 与 DNA 相互作用的模式进行了研究，提出：MB 主要是以嵌入模式与电极表面的 dsDNA 相互作用；而 MB 与电极表面的 ssDNA 的相互作用可能是较复杂的混合模式。

利用 MB 作为电子传递探针，通过分析 MB 在 dsDNA 和 ssDNA 在 PDDA 自组装膜上的电极反应，我们认为长链 DNA 在 PDDA 自组装膜上应该以平躺的方式吸附；通过分析 MB 在裸金、PDDA、dsDNA/PDDA 和 ssDNA/PDDA 膜上的反应速率常数，发现 ssDNA 的电子传递性能优于 dsDNA，并提出 DNA 修饰电极的电子传递主要以横穿链方向进行的电子传递模式。



## Abstract

With the revolutionary developments of Human Genome Project, we are entering a new era of scientific discovery that holds great promise for understanding the complexities of the life. But genome sequencing is only the first step toward achieving an understanding of gene and the following problems we encounter are to make out expression and functions of the sequence-known gene and how they affect the human life, health and disease. Hence, the research on the interaction of DNA with other molecules is significant without question. On the other hand, DNA probe-based biosensors or biochips play a very important role in genome research field and the various applications, such as molecular diagnostics and environment monitoring. Diverse DNA sensors or chips, which can offer faster, higher-throughout or cheaper gene detection, are needed to meet the growing demands.

The immobilization of DNA on surface, especially on conductive surface, is of great interest and important both in studies of DNA sensors or chips and in various other applications. To construct stable DNA sensors or chips, DNA probes must firstly be anchored to a surface to form a DNA recognition layer and subsequently used to detect its complementary sequences.

In this work, a new method of DNA immobilization has been developed. Cationic **PDDA**, which was found to adhere strongly to variety surfaces, was used to facilitate DNA immobilization on the gold surface. It was conceivable that immobilization of the negatively charged DNA onto ordered

positively charged PDDA cations adlayer on the gold surface was greatly facilitated by strong electrostatic interactions. Spectra of Diffuse Reflectance FT-IR (DRFT-IR), X-ray Photoelectron (XPS) and Raman spectroscopy confirmed the immobilization of calf thymus(CT) DNA on electrodes modified by PDDA. STM images of the PDDA self-assembled film manifest the structure of two-dimensional close-packed ordered lines array (2~3nm in width) and the subsequently adsorped DNA strands were immobilized along the direction of PDDA “lines array”, which were also ordered to some extent, and some hanging and winding segments of DNA strands form the some convexity on STM image.

We also introduced Cationic polyelectrlyte--poly(ethylenimine) (PEI) to form a self-assembly monolayer on gold surface and use it to immobilize DNA onto surface. The measurements of XPS, FT-IR and Raman were used to characterize the immobilization of DNA. The results showed that it's also a proper way to anchor DNA onto surface. STM images showed that the structure of PEI self-assembled monolayer is a flat film with many holes (3~6nm in diameter), somewhat like pinholes on n-alkylthiol self-assembled monolayer.

In balancing the performance of two cationic polyelectrolyte self-assembled monolayers(SAMs) and their exercises on immobilization of DNA, PDDA SAMs seemed rather to preponderate on the orientation and electron transfer. Though PEI SAMs proved to be a proper substrate candidate to anchor DNA onto it.

Meanwhile, we introduced another new method to construct high-density DNA array using anodic aluminum oxide(AAO) template. XPS,

DRFT-IR, Raman and AFM methods were exploited for characterization.

PDDA SAMs was employed to investigate the interaction of  $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+/2+}$  with double-stranded(ds) DNA and single-stranded(ss) DNA. The different mode of interaction of ssDNA and dsDNA with  $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+/2+}$  was discussed. The results indicated that PDDA SAMs was a seemly substrate to study the interaction of DNA with other molecules. On the basis of the different electrochemical response resulted from different interaction of  $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+/2+}$  with dsDNA and ssDNA, the electrochemical labeling of DNA hybridization was proposed, i.e., the hybridization can be detected according to the current change of electroactive label at specific potential, which was likely to be used to fabricate electric read-out DNA sensors or chips. The results also showed that combined with  $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+/2+}$  as electroactive label PDDA SAMs could be used to fabricate DNA hybridization sensors.

Two dyes, thionine and methylene blue, were investigated as electrochemical label to detect DNA hybridization on PDDA SAMs and PEI SAMs, respectively. The remarkable increase of peak of cathodal current of MB binding with ssDNA relative to that of MB binding with dsDNA in linear sweep voltammograms indicated that MB can be used as electrochemical label to assay the DNA hybridization. Hybridization of DNA can be detected by the obvious decrease of cathodal current peak of thionine binding with DNA after hybridization. Both thionine and MB proved themselves to serve as label of electrochemical detection of hybridization. In addition, Raman spectroscopy and cyclic voltammetry were exploited to study the interaction mode of DNA with MB. We found that MB interacted

with dsDNA adsorbed on SAMs by intercalation mode; The mode was compound while it interacted with ssDNA, which may include electrostatic interaction,  $\pi$ -interaction and or so.

Using MB as electron transfer probe, we study the electrode reaction of MB on PDDA and PEI SAMs and DNA adsorbed SAMs, we concluded that long-strain DNA seems to be adsorbed onto SAMs by flat lying fashion. The reaction rate constant was approximatively calculated according to the cyclic voltammograms results to compare electron-transfer performance of MB on bare gold, PDDA SAMs, dsDNA/PDDA SAMs and ssDNA/PDDA SAMs. We found that electron transfer of ssDNA was faster than that of dsDNA. We speculated now that electron transfer seems to occur in the direction across the helix.

# 第一章 绪 论

## § 1.1 DNA 电化学研究的意义

1871 年瑞士科学家 Friedrich Miescher 首次从绷带的脓液中分离出“核素”(nuclein, 核酸和蛋白质的复合物), 他的论文为以后研究核酸走出了第一步。核酸分为脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA)两大类, 是由不同的核苷酸组成的。核酸的组成中含有碱基(嘌呤或嘧啶)、戊糖(脱氧核糖或核糖)和磷酸, 其中 RNA 分子中的戊糖为 D-核糖, 碱基为腺嘌呤 A、鸟嘌呤 G、胞嘧啶 C、胸腺嘧啶 T (图 1.1.1)。

1953 年 Watson 和 Crick<sup>[1]</sup>发现了 DNA 的双螺旋结构(图 1.1.2), 建立了分子生物学, 同时也掀起了各学科研究 DNA 的热潮, 直到现在这个热潮仍在继续高涨。DNA 已成为有史以来研究人数最多, 耗资最巨的研究对象<sup>[2]</sup>。

这个热潮还将持续很长一段时间。其主要原因是: DNA 是绝大多数生物的基本遗传物质, 是生命化学的中心, 研究生命现象的关键。

1990 年开始实施的被成为生命科学的“登月计划”的人类基因组计划(Human Genome Project, HGP)给这股热潮注入了巨大的动力。该计划的实施将极大地促进生命科学领域一系列基础研究的发展, 阐明基因的结构与功能关系, 细胞的发育、生长、分化的分子机理, 疾病发生的机理等; 为人类自身疾病的诊断和治疗提供依据, 为医药产业带来翻天覆地的变化; 促进生命科学与信息科学相结合, 刺激相关学科与技术领域的发展, 带动起一批新兴的高技术产业; 基因组研究中发展起来的技术、数据库及生物学资源, 还将推动农业、畜牧业(转基因动、植物)、能源、环境等相关产业的发展, 改变人类社会生产、生活和环境的面貌。

2000 年 6 月 26 日，人类基因组的工作草图提前绘制成功，将这股热潮推到了一个新的高潮。而人类基因组草图的完成仅仅是开始。这不只是因为这个草图只完成了 97% 的人类基因组序列的测定，仍有 3% 的序列需要时间去完成，更重要的是因为，即使完成了全部的测定任务，我们还不能立刻读懂这本“生命之书”。因此，要真正读懂这本大书，还有很长的路要走。

2001 年 2 月 26 日人类基因组计划和塞莱拉基因公司共同公布的结果是：每个人大约有 3 万个基因，且人类在遗传上具有 99.9% 的共性，后者决定了每个人同属于一个生物种属。但是最后的 0.1% 的差异则决定了每个人与他人的不同。人类基因组公布的人类基因数量大大少于原先的估计（科学家以前估计所有人类基因约有 10 万个），这就使得科学家试图通过各种方法来解释为什么如此复杂的生命现象却只有这样少的基因在起作用，由此而产生了各种研究、探索和假设。在未来的 10 至 20 年间，对蛋白质功能的深入研究将逐步阐明生命的复杂机理和许多基因的复杂的生物学功能，而基因变体则是整个生物医学研究中的一个组成部分。各种重大疾病的易感基因以及这些基因之间的相互作用关系，将是研究的重中之重。基因变体的研究是一条有效的研究途径。重要的是要找到这些变体所包含的生物医学意义。

在 DNA 的研究中，化学家起着至关重要的作用。正是化学家发现了 DNA 的双螺旋结构，发明了测定 DNA 序列的方法，而 DNA 的一级结构如何决定其高级结构，高级结构又包含有什么样的信息，如何与其他分子相互识别作用等重大问题，都需要化学家来解答<sup>[3]</sup>。生物体系是一个充满电解质溶液的体系，绝大多数反应都发生在膜系统的界面上，因而，尽管存在着许多物理和化学上的差异，电化学体系仍然是一个非

常好的生物体系模拟，电化学是了解 DNA 的理化性质的绝佳手段之一<sup>[4]</sup>。

DNA 的电化学研究工作始于 1961 年<sup>[5]</sup>，早期的工作主要在于 DNA 的基本电化学行为的研究。八十年代以来其研究范围已扩大到 DNA 的结构和形态分析，DNA 与其他小分子、尤其是能识别特定碱基序列的小分子或一些药物分子之间相互作用及其机理的研究，与生物大分子（尤其是蛋白分子）之间的相互作用及其在基因调控过程中的影响，DNA 电化学传感器、芯片的研究等方面。尤其是通过杂交对特定 DNA 序列检测的电化学研究近年来已成为研究热点之一。

## § 1.2 DNA 与其他分子相互作用的研究

### § 1.2.1 DNA 与其他分子的相互作用研究的意义

分子生物学和分子药理学的发展使人们能够从基因水平上理解某些疾病的发病机理，并通过分子设计来寻找有效的治疗药物。与 DNA 相互作用的靶向化合物成为很重要的药物选择对象。临床上使用的许多抗癌药物都以 DNA 为作用的主要靶点，通过与癌细胞 DNA 发生相互作用破坏其结构，进而影响基因调控与表达的功能，表现出抗癌活性。一些抗病毒药物如治疗艾滋病的药物也是以 DNA 为作用靶点的分子。此外，一些致癌物也能与 DNA 形成加合物，这种 DNA 加合物也是可能癌变的预警标志物。因此，DNA 与其靶向分子相互作用的研究不论是对阐述抗癌、抗病毒药物的作用机理、药物的体外筛选，还是对致癌物

的致癌机理的研究都是非常有意义的。

### § 1.2.2 DNA 同其他分子的相互作用研究与药物设计<sup>[6,7]</sup>

历史上的大部分药物都是通过“筛选”被发现的，只有极少数的药物是纯属偶然被发现。最著名的偶然被发现的药物是英国细菌学家 Alexander Fleming 于 1928 年发现青霉素，但这种机会太少了。为了和疾病作斗争，人们发展了各种模拟疾病过程或状态的体内 (in vivo) 和体外 (in vitro) 系统，用这些系统来筛选和评价来自植物、动物、微生物发酵以及人工合成的各种化合物。随着医学和生物学的进展和人们对疾病发生、发展的更深入的了解，这些筛选系统也由简单直观的动物模型转变为针对疾病治疗靶点的命中率更高的筛选体系。

新药研究的一个新的趋势是基于机理的药物设计 (mechanism based drug design)。因为对某一疾病的生物学和化学有了更多的了解，就可能选择阻止疾病过程的一些特殊的分子靶。基于机理的药物设计通常考虑三个在干扰疾病过程中非常重要的生物靶：酶、受体和核酸。

酶是通常选择的生物靶。越来越多的酶在疾病过程中的作用已经研究清楚，通过基因工程技术已经可以提供较多量的酶。酶的晶体结构有的已经搞清，对于已知的同类型的酶抑制剂的设计可以通过比较这些酶的活性位置以及其他酶抑制剂结构来进行。

受体也是发展新药选用的生物靶。很多激素或具有生物活性的调节物质，它们作用的第一步是作用于受体，再产生信号传递。受体主要存在于细胞膜的组成中，因此它们的结构还不像酶那样知道得比较多。目前已经得到不少受体结构的信息，这在以后药物设计中将是非常有用的。



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库