

DNA 修饰电极的研究^{*}

—— VII 共价键合和吸附 DNA-SAM/Au 修饰电极的制备及表征

陆 琪 庞代文^{**} 胡 深 程介克

(武汉大学化学学院, 武汉 430072)

蔡雄伟 施财辉 毛秉伟 戴鸿平

(厦门大学固体表面物理化学国家重点实验室, 厦门 361005)

摘要 采用先通过 2, 2'-二硫二乙醇自组装得到自组装单分子层 (SAM), 再在 SAM 上共价键合和吸附固定 DNA 的方法制备了两类 DNA 修饰电极, 并对得到的 DNA 修饰电极进行了电化学和谱学表征. 结果表明该方法是可行的, 也是较为理想的在电极表面固定 DNA 的方法.

关键词 DNA 修饰电极 自组装 制备 表征

DNA 修饰电极由于在基因传感器、分子识别以及研究 DNA 与其他分子的相互作用等方面有重要的科学意义和实用价值, 因而正受到广泛关注^{1~3}. DNA 在电极表面的固定是 DNA 修饰电极研究的基础. 目前通过巯基(-SH)在 Au 表面自组装制备 DNA 修饰电极的方法被广泛采用^{1,3,5}. 该方法是先将要固定的 DNA 片断的一端修饰上-SH, 再通过-SH 在 Au 表面的自组装作用得到 DNA 修饰电极. 但该修饰方法存在着一些问题, 诸如-SH 修饰的 DNA 难以合成, 且需要分离提纯, 操作繁琐, 所以十分昂贵; 巯基化合物结合 DNA 后, 其体积大幅度增加, 因此在 Au 表面自组装比较困难. 考虑到上述存在的问题, 我们采用先进行-SH 化合物自组装, 得到自组装单分子层 (SAM), 再在 SAM 上共价键合或吸附固定 DNA 的方法制备 DNA 修饰电极, 并对得到的 DNA 修饰电极进行了电化学和谱学表征.

1 材料与方 法

1.1 试剂

小牛胸腺 DNA (华美生物制品公司) 按文献 [6] 纯化至 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值大于 1.8. Co(phen)₃Cl₂·8H₂O 按文献 [7] 的方法合成. 2, 2'-二硫二乙醇 (DTDE, Fluka), 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺 (EDAC, Sigma), 2-(N-吗啉代)乙磺酸 (MES, Serva), 及其余所用试剂均为分析纯. 实验用水为无菌二次蒸馏水.

1998-10-12 收稿, 1999-01-13 收修改稿

^{*}国家自然科学基金(批准号: 39370213; 39770220; 29773034)、厦门大学固体表面物理化学国家重点实验室基金和湖北省自然科学基金(批准号: 96J037)资助项目

^{**}联系人

1.2 dsDNA 修饰电极的制备

1.2.1 金电极的预处理 金在沸腾的浓硝酸中浸煮 5 min, 取出后用水反复冲洗, 在 1 mol/L H_2SO_4 中进行循环伏安扫描, 扫描上下限分别是 +1.5, +0.2 V, 至得到稳定的循环伏安曲线. 电极的真实面积根据表面氧化物还原峰的电量求得, 为 1.20 cm^2 . 经电化学处理和表征后的金电极, 分别用水和丙酮超声清洗 5 min, 冲洗后立即放入含有 $40 \mu\text{mol/L}$ 的 DTDE 水溶液中, 浸泡 4 h, 得到 DTDE 修饰金电极 (SAM/Au), 冲洗备用.

1.2.2 共价固定的 dsDNA 修饰电极的制备 将 SAM/Au 转入含有 1 mg/mL 活化剂 EDAC 和 0.5 mg/mL 双链 DNA (dsDNA) 的 0.04 mol/L MES-NaOH 缓冲溶液 (pH 6.0) 中, 室温下反应 24 h. 然后, 取出电极, 用 MES 缓冲溶液冲洗, 水中浸泡 4 h, 得到共价固定的 dsDNA 修饰 SAM/Au 电极, 简记为 $(\text{dsDNA})_{\text{c}}\text{-SAM/Au}$. dsDNA 的共价固定是基于 SAM 表面的羟基与被 EDAC 活化后的 dsDNA 5'-磷酸基缩合成磷酸酯而与 SAM 键合.

对照实验用修饰电极的制备方法相同, 但 dsDNA 的 MES-NaOH 缓冲溶液中不含 EDAC 活化剂.

1.2.3 吸附固定的 dsDNA 修饰电极的制备 SAM/Au 在干燥器中干燥后, 取 $30 \mu\text{L}$ dsDNA, 均匀地铺展在电极上; 于干燥器中放置过夜. 取出, 用 MES 缓冲溶液冲洗; 在水中浸泡 4 h, 以除去未吸附的 dsDNA, 得到吸附固定的 dsDNA 修饰 SAM/Au 电极, 简记为 $(\text{dsDNA})_{\text{ad}}\text{-SAM/Au}$.

1.3 仪器与方法

1.3.1 循环伏安 (CV) 实验在 MCEC-II 电化学与电分析测试系统 (厦门大学化学系) 上进行. 实验采用三电极体系, 以裸金电极或修饰金电极为工作电极, 饱和甘汞电极 (SCE) 与铂丝分别作为参比电极和对照电极. 试液为 5 mmol/L KNO_3 或含 $10 \mu\text{mol/L}$ $\text{Co}(\text{phen})_3\text{Cl}_2$ 的 5 mmol/L KNO_3 溶液, 用高纯氮气除去溶解氧. 实验在 25°C 进行.

1.3.2 X 射线光电子能谱 (XPS) XPS 实验以 dsDNA-SAM/Au 为测试对象, 采用 Mg 靶在 VG ESCA-LAB MKII 摄谱仪上进行. 利用 XPS-AES 采集处理程序 (版本 5.0, 清华大学) 采集处理数据. 实验条件: 射线源高压 10 kV; 射线源电流 20 mA; 分析器模式 PE; 倍增器高压 2.9 kV; 扫描次数 20.

1.3.3 扫描隧道显微术 (STM) 采用 Nanoscope IIIa (Digital Instruments, Co.) 在大气和室温下对样品表面进行直接观察, 图象采集为恒电流方式. STM 所用针尖为电化学腐蚀的 W 丝. STM 实验所用金 (111) 单晶按以下步骤制备: 首先将一段直径为 0.8 mm 的洁净金丝在氢/氧焰中灼烧直至形成 1 个熔融的圆球, 然后逐渐退火以缓慢结晶, 最后得到 1 个有 8 个 (111) 单晶面的金球. 其中一面即可用作修饰 dsDNA 并进行 STM 观察的基底.

2 结果与讨论

2.1 2, 2'-二硫二乙醇 SAM 的表征

2.1.1 电化学表征 循环伏安扫描技术可用于考察 SAM 的性能¹⁾. 其基本原则是将 SAM 近似为理想平板电容器, 由界面双电层电容判断 SAM 的厚度, 介电性质和通透性.

D) 董献堆. 自组装单分子层及其在生物电化学中的应用. 武汉大学博士学位论文, 1995

SAM 修饰电极的界面双层电容,可由下式计算:

$$C = \Delta i / (2vA), \quad (1)$$

式中 C 为单位面积界面双层电容 ($\mu\text{F}/\text{cm}^2$); Δi 为电势 0.05 V 处双层充放电电流绝对值之和 (μA); v 为扫描速率 V/s ; A 为由 Au 氧化物的还原峰确定的电极面积 (cm^2).

实验结果表明,由于 DTDE 在 Au 表面的吸附,界面电容减小,并且吸附时间越长,界面电容越小,当吸附时间超过 4 h ,修饰电极的界面电容不再发生变化,说明 DTDE 在 4 h 内可吸附组装形成 SAM,得到稳定的 SAM/Au 电极.因此我们选择浸泡时间 4 h 为后续实验的条件.

图 1 是 SAM 修饰 Au 电极在 $5\text{ mmol}/\text{L KNO}_3$ 底液中的 CV 行为,电势扫描范围 $-0.1 \sim +0.4\text{ V}$. 界面双层电容为 $7.8\ \mu\text{F}/\text{cm}^2$. 实验中发现当扫描上限超过 $+0.7\text{ V}$,修饰电极的电容会增大,表明 SAM 在强电场的作用下会被破坏.

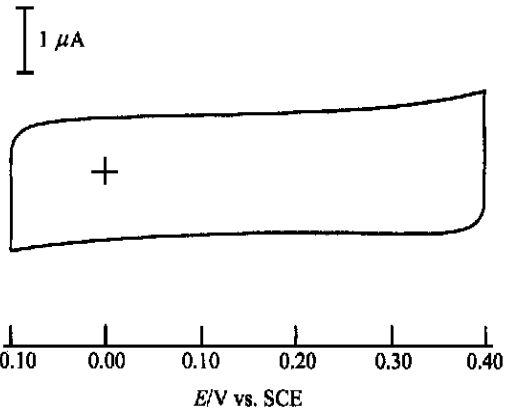


图 1 SAM/Au 电极在 $5\text{ mmol}/\text{L KNO}_3$ 底液中的循环伏安图

2.1.2 STM 表征 图 2(a)为未修饰的 Au(111)表面的 STM 图象 ($67\text{ nm} \times 67\text{ nm}$),图 2(b)是在 DTDE 溶液中浸泡 4 h 后 Au(111)表面的 STM 形貌 ($300\text{ nm} \times 300\text{ nm}$). 可见未修饰前 Au(111)表面尽管分布有一定程度的缺陷(暗点所示,可能由化学处理过程引入),但整体上仍非常平坦. 而经 DTDE 修饰后,可以清楚地看到形成了一层均匀、致密的膜. 如图 2(c) ($50\text{ nm} \times 50\text{ nm}$)所示,在更小的尺度范围内,可以更清楚地看到膜的结构. 当然 SAM 也存在着少数缺陷(STM 图中较暗的部分). 缺陷的产生可能与 Au(111)表面本身的缺陷有关. STM 的实验结果证实了 DTDE 确实在 Au 上形成了均匀的 SAM,这为进一步地修饰 dsDNA 提供了一个极好的界面.

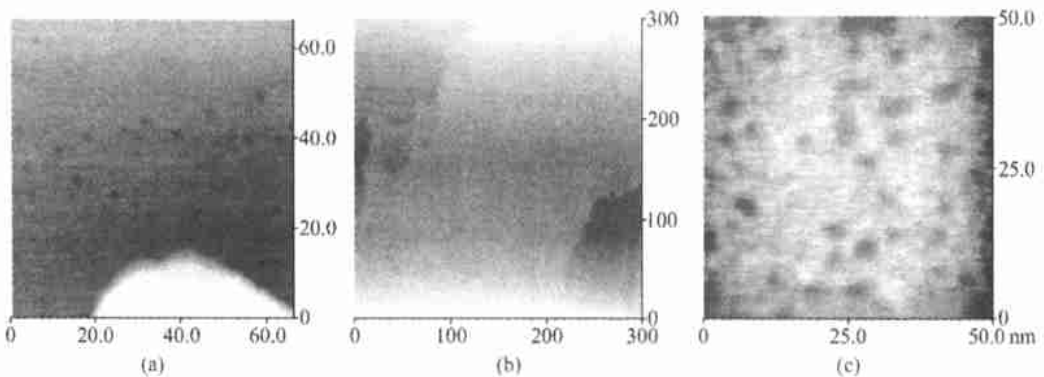


图 2 不同电极表面的 STM 图象

(a) Au(111)表面的 STM 图象; (b) SAM/Au 表面 ($300\text{ nm} \times 300\text{ nm}$); (c) SAM/Au 表面 ($50\text{ nm} \times 50\text{ nm}$). 隧道电流 $1 \sim 2\text{ nA}$, 偏压 50 mV

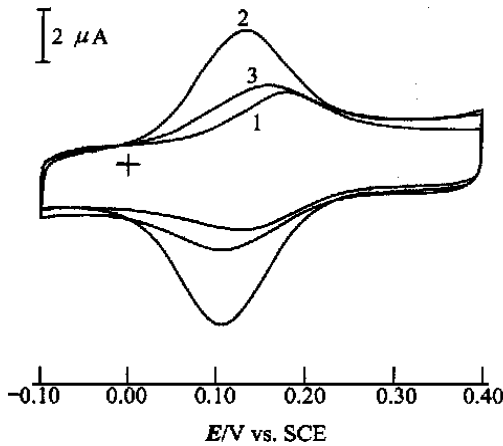


图 3 1×10^{-5} mol/L $\text{Co}(\text{phen})_3^{3+}$ 在不同电极上的 CV 图

1——SAM/Au, 2—— $(\text{dsDNA})_6\text{-SAM/Au}$, 3——对照实验电极. 底液: 5 mmol/L KNO_3 溶液; 扫速: 100 mV/s

2.2 $(\text{dsDNA})_6\text{-SAM/Au}$ 的表征

2.2.1 电化学表征 $\text{Co}(\text{phen})_3^{3+/2+}$ 已被证明与 dsDNA 有很强的相互作用^[8]. 因此, 我们以 $\text{Co}(\text{phen})_3^{3+/2+}$ 为指示剂来表征 dsDNA 修饰电极. 图 3 中曲线 1 是 10^{-5} mol/L $\text{Co}(\text{phen})_3^{2+}$ 在 SAM/Au 上的 CV 图; 图 3 中曲线 2, 3 是在 $(\text{dsDNA})_6\text{-SAM/Au}$ 及对照实验用修饰电极上得到的 CV 图. 根据上述 CV 图得到的实验数据列于表 1 中.

从表 1 的数据中, 可以看出, 无 EDAC 存在时得到的电极对 $\text{Co}(\text{phen})_3^{3+/2+}$ 的响应电流比 SAM/Au 的稍有增大, E^0 负移 18 mV, 这表明在溶液状态且无偶联剂 EDAC 存在时, 只有极少量的 dsDNA 在 SAM 上产生吸附; 而在 EDAC 存在时得到的 $(\text{dsDNA})_6\text{-SAM/Au}$ 对 $\text{Co}(\text{phen})_3^{3+/2+}$ 的响应电流比 SAM/Au 的显著增大, E^0 负移 36 mV, 这是

$\text{Co}(\text{phen})_3^{3+/2+}$ 与电极表面的 dsDNA 相互作用的特征^[4]. 这说明在 EDAC 存在下, 绝大部分固定的 dsDNA 是通过 5' 末端的磷酸基与 SAM 表面的羟基缩合成磷酸酯而共价键合到电极表面.

表 1 在不同电极上得到的 $\text{Co}(\text{phen})_3^{3+/2+}$ 的电化学数据

电极类型	E_{pa}/V	E_{pc}/V	$\Delta E_p/\text{mV}$	E^0/V	$I_{pa}/\mu\text{A}$	$I_{pc}/\mu\text{A}$
SAM/Au	0.175	0.132	43	0.154	1.89	1.48
$(\text{dsDNA})_6\text{-SAM/Au}$	0.130	0.107	23	0.118	4.00	5.00
对照实验电极	0.161	0.111	50	0.136	2.02	2.08

图 4 是还原电流 I_{pc} 对扫速 v 及 $v^{1/2}$ 的关系曲线, 可以看到 I_{pc} 既不与 v , 也不与 $v^{1/2}$ 成线性, I_{pc} 对 $v^{1/2}$ 曲线向上弯曲, 表明 $\text{Co}(\text{phen})_3^{3+/2+}$ 在电极上的电化学反应不单纯是由扩散控制, 而同时存在表面过程, 即在修饰电极表面存在富集效应^[9]. 这从另一个侧面说明了 dsDNA 能被共价键合到电极表面.

2.2.2 XPS 表征 XPS 是一种灵敏的表面元素分析方法, 可以用 XPS 来表征 dsDNA 修饰电极. 从基底 SAM/Au 的 XPS 谱图可知, 在 SAM/Au 表面主要含有 C, O, S, Au 等元素, 未能检测出 N_{1s} 和 P_{2p} 的信号. DNA 的碱基和核糖-磷酸骨架中分别含有 N 和 P, 因此 XPS 谱中 N_{1s} 和 P_{2p} 信号是证明电极表面有无 DNA 存在的重要依据. 通过比

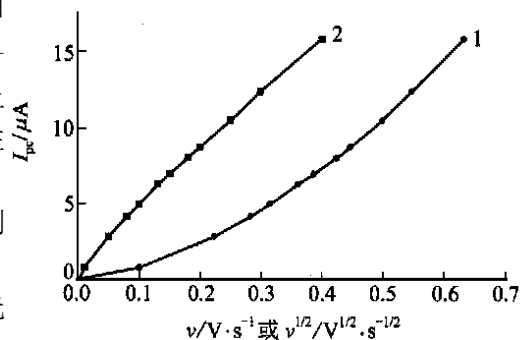


图 4 1×10^{-5} mol/L $\text{Co}(\text{phen})_3^{3+}$ 的 5 mmol/L KNO_3 溶液在 $(\text{dsDNA})_6\text{-SAM/Au}$ 上得到的 I_{pc} 对 v 及 $v^{1/2}$ 关系图
曲线 1 横坐标为 $v^{1/2}$, 单位: $\text{V}^{1/2} \cdot \text{s}^{-1/2}$; 曲线 2 横坐标为 v , 单位: $\text{V} \cdot \text{s}^{-1}$

较不同样品的 N_{1s} 或 P_{2p} 峰的峰面积可估算电极表面 DNA 覆盖量的相对大小^[9], 而 P 则是 DNA 存在的最有力的证据. 图 5 中曲线 1 显示在 EDAC 存在时得到的修饰电极即 $(dsDNA)_b\text{-SAM/Au}$ 上 P_{2p} 特征峰区的能谱曲线, 可见出现了一较宽的 P_{2p} 峰. 图 5 中曲线 2 是对照实验电极在同样区域内的谱线, P_{2p} 峰未出现. 这一结果证实了在 EDAC 存在时 dsDNA 确实被共价键合到电极表面. 由于对照实验电极表面仅存在少量吸附的 dsDNA, 以致观察不到 P_{2p} 的 XPS 信号.

结合前面的电化学表征, 我们不难看出, 两者得出的结论是一致的, 即 EDAC 存在时, 电极表面有高的 DNA 载量, 绝大部分的 dsDNA 是通过 EDAC 的活化使 5' 末端的磷酸基与 SAM 表面的羟基缩合而共价修饰到电极表面. 而对照电极仅有少量的 dsDNA 吸附到 SAM/Au 表面.

$(dsDNA)_b\text{-SAM/Au}$ 具有很高的稳定性. 将该电极在 5 mmol/L 的 KNO_3 溶液中浸泡 24 h 后, 对 $Co(phen)_3^{3+/2+}$ 的 CV 响应电流与浸泡前完全一样.

2.3 $(dsDNA)_{ad}\text{-SAM/Au}$ 的表征

2.3.1 电化学表征 与前述共价键合 dsDNA 修饰电极的电化学表征类似, 表 2 列出了 $(dsDNA)_{ad}\text{-SAM/Au}$ 在 10 $\mu\text{mol/L}$ $Co(phen)_3^{2+}$ 中得到的 CV 数据. 与 SAM/Au 上的相比, 在 $(dsDNA)_{ad}\text{-SAM/Au}$ 上 $Co(phen)_3^{3+/2+}$ 的响应电流显著增大, 式电势 $E^{0'}$ 负移 43 mV, 这表明 dsDNA 可通过干燥吸附方法^[6] 修饰到 SAM/Au 电极上.

表 2 在不同电极上得到的 $Co(phen)_3^{3+/2+}$ 的电化学数据

电极类型	E_{pa}/V	E_{pc}/V	$\Delta E_p/mV$	$E^{0'}/V$	$I_{pa}/\mu A$	$I_{pc}/\mu A$	I_{pa}/I_{pc}
SAM/Au	0.175	0.132	43	0.154	1.89	1.48	1.28
$(dsDNA)_{ad}\text{-SAM/Au}$	0.133	0.090	43	0.111	7.89	10.00	0.79
$(dsDNA)_b\text{-SAM/Au}$	0.130	0.107	23	0.118	4.00	5.00	0.80

I_{pc} 对 v 及 $v^{1/2}$ 的关系也与图 4 类似, 不成线性, 同样也说明 dsDNA 能被干燥吸附固定到电极表面.

2.3.2 XPS 表征 图 6 显示 $(dsDNA)_{ad}\text{-SAM/Au}$ 的 P_{2p} 的特征峰区的 XPS 能谱峰. 我们可以清楚地看到 P_{2p} 的信号, 表明 dsDNA 能通过干燥吸附方法固定到 SAM 上, 得到 $(dsDNA)_{ad}\text{-SAM/Au}$ 修饰电极.

2.3.3 STM 表征 对 $(dsDNA)_{ad}\text{-SAM/Au}$ 进行了 STM 观察(如图 7), 与图 2(c)中的 SAM 的 STM 相比有显著区别. 图 2(c)中亮的部分十分集中, 暗的部分较少, 层次感不强, 这正表明了 DTDE 形成了平整, 均匀的 SAM. 而图 7 中亮的部分较为分散, 暗的部分明显增多, 亮暗分布较有规律. 在与水平线成一定角度的方向上呈现一条条的亮区, 有很强的层次感, 这可能就是吸附的 dsDNA. 由于 dsDNA 之间存在静电斥力, 使得 SAM 表面上吸附的 dsDNA 之间保持有一定



图 5 $(dsDNA)_b\text{-SAM/Au}$ (曲线 1)和对照实验电极(曲线 2)的 P_{2p} 特征峰区的 XPS 谱图

的距离, 排列有序, 分布均匀. 进一步分析图 7 的成象条件, 对于已吸附有 dsDNA 的 SAM/Au, 预计表面将较为疏松, 导电性也将下降, 故需使用较小的隧道电流和较大的隧道偏压才能得到清楚的 STM 图象, 这也可用以支持 dsDNA 确已吸附到 SAM/Au 表面, 且排列较有规律.

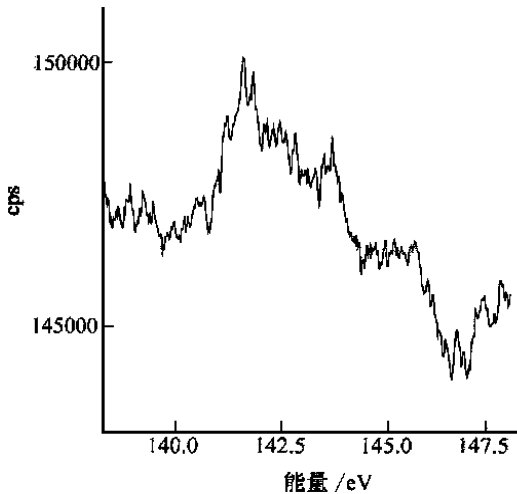


图 6 (dsDNA)_{ad}-SAM/Au 的 P_{2p} 特征峰区的 XPS 谱图

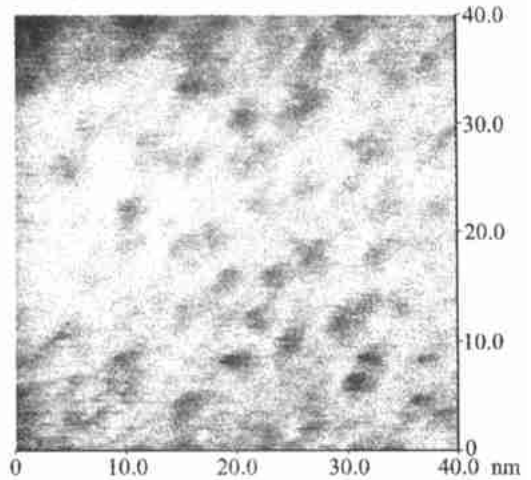


图 7 (dsDNA)_{ad}-SAM/Au 表面的 STM 图象(40 nm×40 nm)

隧道电流: 0.28 nA, 偏压: 0.5 V

与(dsDNA)_b-SAM/Au 的稳定性相比, (dsDNA)_{ad}-SAM/Au 的稳定性稍差, 在 5 mmol/L 的 KNO₃ 溶液中浸泡 24 h 后, 再在 Co(phen)₃²⁺ 溶液中进行 CV 扫描, 得到的响应电流比浸泡前下降 8%。dsDNA 吸附修饰电极的稳定性比其共价键合修饰电极的差是可以理解的.

2.4 (dsDNA)_b-SAM/Au 和 (dsDNA)_{ad}-SAM/Au 修饰电极的比较

比较在共价键合 dsDNA 修饰电极和吸附 dsDNA 修饰电极上得到的 CV 数据(见表 2), 我们不难发现两者的 I_{pa}/I_{pc} 都近似等于 0.8 而与 SAM/Au 上得到的结果(1.28)完全不同, 说明 DNA 的固定是成功的. 但两种修饰方法得到的修饰电极在 Co(phen)₃²⁺ 溶液中的电化学行为的区别也是显而易见的. 由 ΔE_p 可知 Co(phen)₃^{3+/2+} 在共价键合 dsDNA 修饰电极上反应的可逆性比在吸附 dsDNA 修饰电极上的要好. 对于(dsDNA)_b-SAM/Au, 由于 dsDNA 是共价键合到 SAM 上的, Co(phen)₃^{3+/2+} 与 dsDNA 结合后, 可以通过具有电子传递功能的 dsDNA 加快与电极间的电子交换速率^[3], 因而对 Co(phen)₃^{3+/2+} 的氧化还原有好的可逆性, 峰电势差小($\Delta E_p=23$ mV, 100 mV/s). 而根据吸附修饰 dsDNA 电极的表面结构, 表面的 dsDNA 是通过化学吸附固定的, 因而 Co(phen)₃^{3+/2+} 不能通过 dsDNA 加快与电极表面的电子交换, 因此其氧化还原可逆性($\Delta E_p=43$ mV, 100 mV/s)就不如在(dsDNA)_b-SAM/Au 上的好, 而与在 SAM/Au 上的可逆性相似.

SAM 上共价键合 dsDNA 与吸附固定 dsDNA 制备 dsDNA 修饰电极方法各有优点, 前者得到的电极稳定性高, 表面结构有序, 而后者 DNA 用量较小, DNA 的载量高, 两种方法都有其各自的应用前景.

SAM 上吸附或共价键合修饰 DNA 与直接在电极表面吸附或活化后共价键合相比, 有如下优

点. 1) 由于SAM的结构特点,使其为DNA的固定提供了一个稳定、均一、反应位点多的理想表面,并可根据不同的需要,提供不同官能团的表面¹⁰. 2) SAM使DNA和可能与DNA相互作用的生物物质避免与电极表面的直接接触,从而可以防止可能发生的变性. 3) 利用SAM对电极的封闭作用,可以消除由吸附产生的对金属电极的毒化. 所有这些优点使得本文所采用的修饰方法将有可能在基因传感器、DNA与其他分子的相互作用、以及DNA识别分析中得到应用.

3 结论

采用在金表面先修饰2,2'-二硫二乙醇SAM,再共价键合和吸附固定dsDNA分别得到了两类不同的dsDNA修饰金电极,并对修饰电极进行了电化学和谱学表征. 结果表明该方法是可靠和较理想的DNA修饰电极的制备方法. 制备的DNA修饰电极将在电化学基因传感器和DNA与其他分子的相互作用研究等方面有应用前景.

致谢 实验工作得到厦门大学分析测试中心王水菊老师的大力支持,谨致谢忱.

参 考 文 献

- 1 Mikkelsen S R. Electrochemical biosensors for DNA sequence detection. *Electroanalysis*, 1996 8(1): 15
- 2 Xu X H, Bard A J. Immobilization and hybridization of DNA on an aluminum (III) alkanebisphosphonate thin-film with electrogenerated chemiluminescent detection. *J Am Chem Soc*, 1995 117(9): 2 627
- 3 Hashimoto K, Ito K, Ishimori Y. Sequence-specific gene detection with a gold electrode modified with DNA probes and an electrochemically active dye. *Anal Chem*, 1994 66: 3 830
- 4 Pang D W, Abuña H D. Micromethod for the investigation of the interactions between DNA and redoxactive molecules. *Anal Chem*, 1998 70: 3 162
- 5 Kelley S O, Barton J K, Jackson N M, et al. Electrochemistry of methylene blue bound to a DNA-modified electrode. *Bioconjugate Chem*, 1997 8(1): 31
- 6 Pang D W, Zhang M, Wang Z L, et al. Modification of glassy carbon and gold electrodes with DNA. *J Electroanal Chem*, 1996 403: 183
- 7 Yamasaki K, Hara T, Yasuda M. Absorption spectra of cobalt complex with 1, 10-phenanthroline. *Proc Jpn Acad*, 1953 29: 337
- 8 Cater M T, Rodriguez M, Bard A J. Voltammetric studies of the interaction of metal-chelates with DNA. 2. Tris-chelated complexes of cobalt (III) and iron(II) with 1, 10-phenanthroline and 2, 2'-bipyridine. *J Am Chem Soc*, 1989 111(24): 8 901
- 9 Heme T M, Tarlov M J. Characterization of DNA probes immobilized on gold surfaces. *J Am Chem Soc*, 1997 119: 8 916
- 10 Wink T, van Zuijen S J, Bult A, et al. Self-assembled monolayers for biosensors. *Analyst*, 1997 122(4): 43R