

电化学石英晶体微天平研究界面电场对 DNA 杂交的影响

梁金玲 周剑章* 陈巧琳 林玲玲 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, 福建 厦门 361005)

摘要: 采用电化学石英晶体微天平, 现场监测不同界面电场下完全匹配的靶标 DNA 和不完全匹配的靶标 DNA 分别与寡聚核苷酸探针分子杂交的过程. 结果表明, 电极表面荷正电时 DNA 表观杂交效率比电极表面荷负电时高, 但假阳性比较显著; 而电极表面荷负电时能有效地抑制错配杂交. 探讨了引入界面电场后探针分子取向和微观作用力对 DNA 杂交的影响.

关键词: 电化学石英晶体微天平; DNA 杂交; 界面电场; 假阳性

中图分类号: O646

Effect of Interface Electric Field on DNA Hybridization Studied by Electrochemical Quartz Crystal Microbalance

LIANG Jin-Ling ZHOU Jian-Zhang* CHEN Qiao-Lin LIN Ling-Ling LIN Zhong-Hua

(State Key Laboratory for Physical Chemistry of the Solid Surface, Department of Chemistry, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian Province, P. R. China)

Abstract: The hybridization of oligonucleotide probe with matched or mismatched DNA target was monitored by a combination of electrochemical control and *in situ* quartz crystal microbalance technique. The results indicated that the apparent efficiency of hybridization for matched DNA target at a positive potential was higher than that at a negative potential. But an obvious response of "false positives" may be obtained at the positive potential. Application of negative potential can availably halt hybridization for mismatched target DNA. The effect of the orientation of oligonucleotide probe and micro forces on DNA hybridization under interface electric field was discussed.

Key Word: Electrochemical quartz crystal microbalance(EQCM); DNA hybridization; Interface electric field; False positives

由于基因检测和临床医学诊断的需要, 基因传感器和基因芯片的研究引起了广大科研工作者的关注. 基因传感器研究的基础是修饰在固体表面上 DNA 探针分子与溶液中靶标 DNA 的杂交. 由于粒子-界面相互作用, 界面浓度梯度及位阻现象等原因, 这种固-液相界面反应与溶液相中同样的反应相比, 热力学及动力学性质有很大不同. 传感器表面的 DNA 杂交与检测的最优化条件往往是有冲突的(尤其是在电化学基因传感器中)^[1]. (1) 强吸附有利于 DNA

探针分子在传感器表面的固定, 有利于增大检测信号, 但强吸附的同时可能会加剧非特异性吸附, 从而降低 DNA 杂交的特异性及阻碍杂交的进行; (2) 为了降低检测限, 传感器的面积应尽可能小, 但为了更容易捕获靶标 DNA, 又需要面积相对大的传感器. 在前人的工作^[2-10]中, 为了减少探针分子与固体表面的非特异性吸附, 一般采用在传感器表面组装探针分子后, 再修饰烷基硫醇的方法. 但这种方法也不能完全除去非特异性吸附, 而且组装烷基硫醇后, 降低

Received: April 20, 2007; Revised: May 21, 2007; Published on Web: July 6, 2007.

*Corresponding author. Email: jzzhou@xmu.edu.cn; Tel/Fax: +86592-2189663.

国家自然科学基金(20423002)资助项目

了传感器表面探针分子的覆盖度,不利于提高 DNA 检测的灵敏度。

Heaton 等^[4]采用表面等离子共振(SPR)光谱技术,研究了界面电场对 DNA 杂交和变性的影响.通过控制正的电极电位富集带负电荷的靶标 DNA,此时杂交效率较高,但容易发生错配杂交(假阳性);控制较负的电极电位排斥靶标 DNA,使探针分子基本上不能杂交,还能在几分钟内使大部分错配杂交的 DNA 解链.他们认为,界面电场主要通过电极与靶标 DNA 之间的库仑力来影响 DNA 杂交.我们^[5]对自组装 DNA 的电化学现场表面增强拉曼光谱(SERS)研究表明,DNA在电极表面形成双螺旋时,以B型构象存在,且可以通过控制界面电场使DNA探针分子在电极表面的吸附取向在垂直-斜插-平躺之间有规律地变化,认为引入界面电场后,探针分子的取向变化也会影响到 DNA 的杂交过程.

本研究采用电化学石英晶体微天平(EQCM),现场监测不同界面电场下完全匹配的靶标 DNA 和不完全匹配的靶标 DNA 分别与探针分子杂交过程,研究施加界面电场对 DNA 杂交过程的影响.

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

现场EQCM检测系统由Model 263恒电位仪(EG&G PAR)和QCA-917石英晶体微天平(Perkin Elmer Instruments)组成;电解池由三电极系统组成:AT-cut石英晶振电极(双面镀金,9 MHz,金电极的几何面积是0.196 cm²,质量灵敏度为1.07 ng·Hz⁻¹)为工作电极,铂电极为对电极,饱和甘汞电极为参比电极(本文中电位均相对于饱和甘汞电极的电位).

由 31 个碱基组成的寡聚核苷酸均由上海生物工程技术服务公司(Sangon)提供,使用前没有进一步纯化,DNA 探针分子(HS-ssDNA)碱基顺序为 5'-HS-(CH₂)₆-GTAAAACGACGGCCAGTTATAACTA-TCCTA-3'(摩尔质量为 9451 g·mol⁻¹),将其分别溶于三羟甲基氨基甲烷(Tris)缓冲溶液(10 mmol·L⁻¹ Tris+10 mmol·L⁻¹ NaCl, pH=7.4),并稀释至 *c*(HS-ssDNA)为 16 μmol·L⁻¹.其完全匹配靶标 DNA 的碱基顺序为 5'-TAGGAATAGTTATAACTGGCCG-TCGTTTTAC-3'(摩尔质量为 9504 g·mol⁻¹),不完全匹配靶标 DNA 的碱基(9 个碱基错配)顺序为 5'-CCCTTGCCCTTATAACTGGCCGTCGTTTTAC-3'(摩尔质量为 9328 g·mol⁻¹),将其分别溶于Tris杂交

缓冲溶液(10 mmol·L⁻¹ Tris+1 mol·L⁻¹ NaCl, pH=7.4,以下所提及的Tris杂交缓冲溶液均为这个配比)并稀释至*c*(DNA target)为 16 μmol·L⁻¹.其他试剂均为分析纯.实验所需的水溶液均经Millipore Milli-Q(≥18 MΩ·cm)超纯水净化系统过滤后的超纯水配制.

1.2 电位的选择

由工作电极在 Tris 杂交缓冲溶液中的循环伏安图可得其理想极化区为-200 mV~+400 mV.在这一电位区间内,电极表面不发生氧化还原反应,无法拉第电流影响 DNA 杂交.修饰了 HS-ssDNA 的电极在 Tris 杂交缓冲溶液中的零荷电位为+100 mV.在本实验中,选取+350 mV 和-100 mV 作为研究电位,使电极表面分别荷正电和荷负电.

1.3 探针分子自组装单层的制备及组装量的测量

工作电极先用 0.1 mol·L⁻¹ H₂SO₄ 溶液进行电化学清洗后,用超纯水冲洗,真空抽干 30 min.另取一石英晶振电极作参考电极,分别测量工作电极和参考电极的频率及相应的导纳,然后在工作电极表面滴加 30 μL 经过二硫苏糖醇(DTT)处理的 HS-ssDNA 溶液^[6],室温下自组装 2 h.用超纯水浸洗工作电极,除去未组装的探针分子.真空抽干 30 min 后,分别测量工作电极或参考电极的频率和导纳.

石英晶振电极的频率变化不但与电极表面的质量变化有关,干态下电极频率还与导纳成线性关系.根据工作电极和参考电极各自的工作曲线(图 1)进行计算,比较导纳相同时的频率变化,再扣除参考电极在工作电极组装探针分子期间由于系统误差引起的频率变化,得到工作电极在探针分子自组装后下降的频率.由该频率可通过 Sauerbrey^[17]方程和公式(1)计算探针分子在电极表面的覆盖度(θ),

$$\theta = \frac{\Delta f_i \times S_i \times 6.02 \times 10^{23}}{M_{\text{probe}} \times A} \quad (1)$$

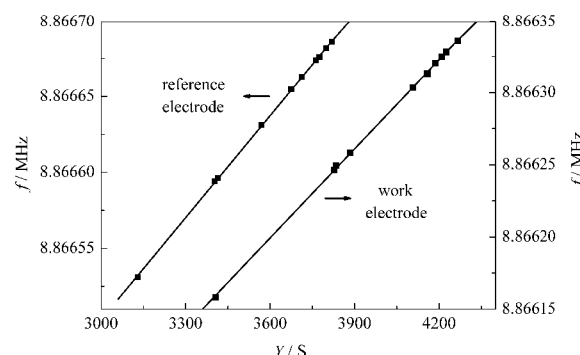


图 1 电极的频率(f)与导纳(Y)的关系曲线
Fig.1 Plots of frequency (f) vs admittance (Y)

式中, Δf_1 为组装探针分子后下降的电极频率, S_f 为质量灵敏度, M_{probe} 为 DNA 探针分子的摩尔质量, A 为电极面积. 由实验数据求得探针分子在电极表面自组装单层的覆盖度约为 2.2×10^{13} molecules \cdot cm $^{-2}$.

1.4 EQCM 监测杂交过程

将修饰了探针分子的工作电极浸入 Tris 杂交缓冲溶液中, 通高纯氮气 30 min. 当电极电位由开路电位转到所控电位时, 并未引起明显的电极频率变化, 这表明电位转换并未引起电极表面探针分子脱附, 待工作电极频率稳定后(在 30 min 内频率变化范围在 2~3 Hz), 往 Tris 杂交缓冲溶液中滴加靶标 DNA 溶液, 用 EQCM 现场监测不同界面电场下 DNA 的杂交过程, 把电极频率变化趋于稳定时作为杂交终点. 通过公式(2) 计算表观杂交效率(η),

$$\eta = \frac{\Delta f_2 \times M_{\text{probe}}}{\Delta f_1 \times M_{\text{target}}} \times 100\% \quad (2)$$

式中, Δf_2 为杂交过程中下降的电极频率(Δf_1 与对应的 Δf_2 均在同一工作电极上得到), M_{target} 为靶标 DNA 的摩尔质量. 假设界面变化对电极频率的影响可忽略, 则 Δf_1 等效于组装到电极表面的探针分子数目, Δf_2 等效于结合到电极表面的靶标 DNA 数目(主要通过和探针分子杂交的方式). 由吸收光谱测得靶标 DNA 在杂交溶液中的浓度约为 2.5×10^{-7} mol \cdot L $^{-1}$.

2 结果与讨论

EQCM 监测不同界面电场下 DNA 探针分子与完全匹配靶标 DNA 和不完全匹配靶标 DNA 杂交过程的结果分别如图 2 和图 3 所示. 从图 2 可看出, 工作电极表面荷正电时, 探针分子与完全匹配的靶标 DNA 杂交后, 电极频率下降 33 Hz(曲线 a, 实验测

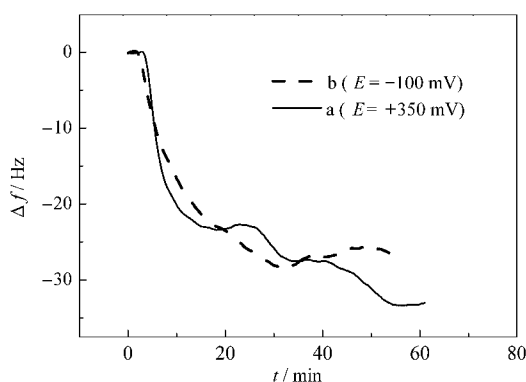


图 2 与完全匹配靶标 DNA 杂交时频率对时间的响应
Fig.2 Response of frequency on time for hybridization of a complementary target DNA

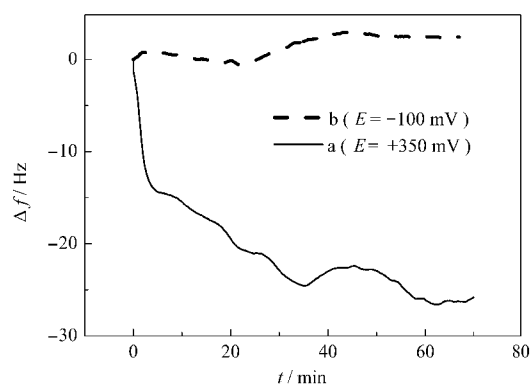


图 3 与不完全匹配靶标 DNA 杂交时频率对时间的响应
Fig.3 Response of frequency on time for hybridization of a non-complementary target DNA

得该电极在自组装探针分子单层后, 频率下降 59 Hz), 计算可得表观杂交效率为 56%; 工作电极表面荷负电时, 探针分子与完全匹配的靶标 DNA 杂交后, 电极频率下降 25 Hz(曲线 b, 该电极在自组装探针分子单层后, 频率下降 64 Hz), 计算可得表观杂交效率为 39%.

从图 3 可看出, 电极表面荷正电时, 探针分子与不完全匹配的靶标 DNA 杂交后, 电极频率下降 27 Hz(曲线 a, 该电极在自组装探针分子单层后, 频率下降 62 Hz), 表观杂交效率为 44%; 电极表面荷负电时, 在探针分子与不完全匹配的靶标 DNA 杂交过程电极的频率响应和背景时频率响应一致(曲线 b), 表明此时基本上没有错配杂交.

以上结果表明, 电极表面荷正电时, 探针分子与完全匹配的靶标 DNA 的表观杂交效率较高, 与不完全匹配的靶标 DNA 有明显的杂交响应(假阳性); 而电极表面荷负电时, 探针分子与完全匹配的靶标 DNA 的表观杂交效率稍低, 但与不完全匹配的靶标 DNA 没有杂交响应. 引入界面电场后, 在电极表面探针分子与靶标 DNA 杂交时, 存在 DNA 分子间互补碱基对的氢键, 分子与电极表面的非特异性吸附, 分子间和分子与电极表面间的库仑力等各种微观作用力. 其中, 电极表面荷正电时, DNA 与电极表面间的库仑力表现为吸引力; 当电极表面荷负电时, DNA 与电极表面间的库仑力表现为排斥力. 当工作电极表面荷正电时, 滴加完全匹配的靶标 DNA 后, 大量带负电荷的靶标 DNA 通过库仑吸引力迁移到工作电极附近, 使靶标 DNA 在电极附近的浓度升高, 增大了与探针分子杂交的几率. 但是, 探针分子此时在电极表面为平躺吸附取向^[15], 该取向使探针分子与电极表面的非特异性吸附达到最大, 从而大

大减弱了 DNA 杂交的特异性. 靶标 DNA 要克服 DNA 与电极表面间的库仑吸引力, DNA 分子间的库仑排斥力以及探针分子与电极表面的非特异性吸附, 才能与探针分子杂交. 所以, 在电极表面荷正电时 DNA 的杂交与在溶液相的杂交有很大不同.

我们认为电极表面荷正电时能测得较强的杂交信号, 除了通常认为的探针分子和靶标 DNA 完全互补杂交的响应外, 还可能有以下因素: (1) 探针分子只和靶标 DNA 的局部互补碱基形成了氢键; (2) 靶标 DNA 通过与电极表面的库仑吸引力, 吸附在电极表面或附近从而引起电极频率下降. 若把完全匹配的靶标 DNA 换成不完全匹配的靶标 DNA, 电极表面荷正电时假阳性信号显著(如图 3 曲线 a), 也证明了这一点. 反之, 当工作电极表面荷负电时, 探针分子在电极表面为垂直吸附取向^[15], 该取向使得探针分子与电极表面的非特异性吸附达到最小. 当电极表面荷负电时, 探针分子与不完全匹配的靶标 DNA 相互作用后基本上没有杂交信号(如图 3 曲线 b). 这说明该负电位下探针 DNA 的取向使探针分子能识别错配碱基, 保持了 DNA 杂交的特异性, 从而有效抑制假阳性. 但在电极表面荷负电时探针分子与完全匹配的靶标 DNA 的表观杂交效率较低, 这是因为带负电荷的靶标 DNA 受到电极表面的库仑排斥力而难以靠近工作电极, 使靶标 DNA 在工作电极附近的浓度较低所致. 进行负电位选择时, 主要考虑以下两个因素: 首先, 使探针分子在电极表面为垂直吸附取向(根据我们之前电化学现场 SERS 的结果可知, 当电极电位为 0 - -400 mV 时, 探针分子垂直吸附在电极表面^[15]); 其次, 电位选择不能过负, 否则会使电极表面对靶标 DNA 的库仑排斥力过大, 降低靶标 DNA 在工作电极附近的浓度. 而 Heaton 等^[4]可能是因为选取了较负电位(比零荷电位负 400 mV), 使探针分子基本上不能杂交. 所以, 实验中选择比零荷电位负 200 mV 的电位较合适.

控制合适的负电位, 探针分子在电极表面为垂直吸附取向, 此时无需在电极表面修饰烷基硫醇也能减少探针分子与电极表面的非特异性吸附. 本文工作电极上探针分子的覆盖度高达 2.2×10^{13} molecules \cdot cm⁻², 为文献[2-14]采用烷基硫醇修饰法所得结果的 3-14 倍. 由于电极表面荷负电时探针分子在电极表面覆盖度较高, 杂交后捕获的互补靶标 DNA 的覆盖度为 8.6×10^{12} molecules \cdot cm⁻², 约为烷基硫醇修饰法的 2-8 倍^[2-4], 由此可见, 控制负电位的方

法有利于提高探针分子的覆盖度, 增大单位面积捕获靶标 DNA 的能力, 从而提高了检测的灵敏度.

3 结论

本文通过 EQCM 监测控制界面电场下 DNA 的杂交过程.

1) 控制合适的正电位, 通过库仑吸引力富集靶标 DNA 到工作电极附近, 增大了与探针分子杂交的几率, 但此时探针分子在电极表面为平躺吸附取向, 该取向使探针分子与电极表面的非特异性吸附达到最大, 从而大大减弱了 DNA 杂交的特异性, 容易导致假阳性.

2) 控制合适的负电位使探针分子在电极表面保持垂直吸附取向, 该取向使探针分子与电极表面的非特异性吸附达到最小, 优化了杂交条件, 有利于保持 DNA 杂交的特异性, 从而有效抑制假阳性.

3) 无需在电极表面修饰烷基硫醇, 电极表面探针分子的覆盖度高达 2.2×10^{13} molecules \cdot cm⁻², 简化了操作步骤, 提高了检测的灵敏度.

References

- 1 Paleček, E.; Fojta, M.; Jelen, F. *Bioelectrochemistry*, **2002**, *56*: 85
- 2 Lao, R. J.; Song, S. P.; Wu, H. P.; Wang, L. H.; Zhang, Z. Z.; He, L.; Fan, C. H. *Anal. Chem.*, **2005**, *77*: 6475
- 3 Peterlinz, K. A.; Georgiadis, R. M.; Herne, T. M.; Tarlov, M. J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*: 3401
- 4 Heaton, R. J.; Peterson, A. W.; Georgiadis, R. M. *PNAS*, **2001**, *98*: 3701
- 5 Herne, T. M.; Tarlov, M. J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*: 8916
- 6 Levicky, R.; Herne, T. M.; Tarlov, M. J.; Satija, S. K. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*: 9787
- 7 Peterson, A. W.; Wolf, L. K.; Georgiadis, R. M. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*: 14601
- 8 Wang, J.; Li, J. H.; Baca, A. J.; Hu, J. B.; Zhou, F. M.; Yan, W.; Pang, D. W. *Anal. Chem.*, **2003**, *75*: 3941
- 9 Gao, Y.; Wolf, L. K.; Georgiadis, R. M. *Nucleic Acids Res.*, **2006**, *34*: 3370
- 10 Steel, A. B.; Herne, T. M.; Tarlov, M. J. *Bioconjugate Chem.*, **1999**, *10*: 419
- 11 Huang, E.; Satjapipat, M.; Han, S. B.; Zhou, F. M. *Langmuir*, **2001**, *17*: 1215
- 12 Li, J. H.; Hu, J. B.; Ding, X. Q.; Li, Q. L. *Chem. J. Chin. Univ.*, **2005**, *26*(8): 1432 [李金花, 胡劲波, 丁小勤, 李启隆. 高等学校化学学报, **2005**, *26*(8): 1432]
- 13 Hwang, S.; Kim, E.; Kwak, J. *Anal. Chem.*, **2005**, *77*: 579
- 14 Georgiadis, R.; Peterlinz, K. P.; Peterson, A. W. *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*: 3166
- 15 Dong, L. Q.; Zhou, J. Z.; Wu, L. L.; Dong, P.; Lin, Z. H. *Chem. Phys. Lett.*, **2002**, *354*: 458
- 16 Xu, D. K.; Ma, L. R.; Liu, Y. Q.; Jiang, Z. H.; Liu, Z. H. *Analyst*, **1999**, *124*: 533
- 17 Sauerbrey, G. Z. *Phys.*, **1959**, *155*: 206