

灿烂甲酚蓝在 DNA 修饰金电极上的电化学反应

孙 伟* 杨茂霞 钟江华 焦 奎

(青岛科技大学化学与分子工程学院, 山东 青岛 266042)

摘要: 利用自组装技术将巯基乙醇固定在金电极表面形成巯基乙醇自组装膜修饰金电极, 用乙基-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC)和 *N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS)为偶联试剂, 分别将鲑鱼精单链 DNA(ssDNA)和双链 DNA(dsDNA)固定于金电极表面形成 ssDNA 和 dsDNA 修饰电极. 考察了灿烂甲酚蓝(BCB)在不同 DNA 修饰电极上的电化学反应, 结果表明, BCB 在 ssDNA 和 dsDNA 修饰电极上的吸附常数分别为 1.67×10^4 和 $3.22 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, BCB 与 ssDNA 主要以静电作用结合, 而与 dsDNA 作用存在静电和嵌插两种模式. dsDNA 对 BCB 具有更高的亲和力, 使 BCB 可以作为一种有效的电化学反应指示剂.

关键词: 巯基乙醇; DNA; 自组装膜; 金电极; 电化学; 灿烂甲酚蓝

中图分类号: O646

Electrochemical Behaviors of Brilliant Cresyl Blue on DNA Modified Gold Electrode

SUN Wei* YANG Mao-Xia ZHONG Jiang-Hua JIAO Kui

(College of Chemistry and Molecular Engineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao 266042, Shandong Province, P. R. China)

Abstract: DNA modified electrode was prepared by covalent immobilization of ssDNA or dsDNA on a mercaptoethanol monolayer self-assembled gold electrode with the help of *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimidehydrochloride (EDC) and *N*-hydroxysuccinimide (NHS). The electrochemical behaviors of brilliant cresyl blue (BCB) on ssDNA or dsDNA electrodes were studied. BCB had different binding models with ssDNA or dsDNA and the adsorptive constants were $1.67 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ for ssDNA/Au electrode and $3.22 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$ for dsDNA/Au electrode. BCB bound to ssDNA *via* electrostatic interaction while bound to dsDNA through both the electrostatic and intercalative models. The results showed that dsDNA had a stronger affinity for BCB, which indicated that BCB was a suitable electroactive indicator.

Key Words: Mercaptoethanol; DNA; Self-assembled monolayer; Gold electrode; Electrochemistry; Brilliant cresyl blue

DNA 修饰电极是 20 世纪 80 年代出现的一类生物修饰电极, 它在基因传感器、分子识别、基因检测和检测小分子与 DNA 相互作用等方面有着重要的应用前景^[1-6]. DNA 修饰电极的制备方法有吸附法、自组装膜法、共价键合法、组合法等^[7,8], 其中自组装膜法是最常用的方法之一, 多是利用巯基化合物在金电极表面上自组装形成高度有序的单分子膜后再进一步固定 DNA^[9]. Ju 等人^[10]采用巯基乙酸自

组装膜法固定肝炎病毒 DNA 片段并用于 PCR(聚合酶链式反应)产物的电化学反应检测. Pang 等人^[11]比较了巯基乙醇、半胱胺和巯基丙酸等三种不同巯基化合物自组装单层膜固定 DNA 的方法, 结果发现巯基乙醇的固定效果最好.

本文利用巯基乙醇自组装到金电极的表面形成自组装单分子膜, 进一步利用共价键合法制备了单、双链 DNA 修饰电极, 以灿烂甲酚蓝(BCB)为电化

Received: September 7, 2006; Revised: November 13, 2006; Published on Web: March 9, 2007.

*Corresponding author. Email: sunwei@qust.edu.cn; Tel: +86532-84022681.

国家自然科学基金(20405008, 20635020)和青岛科技大学博士基金(0022125)资助项目

© Editorial office of Acta Physico-Chimica Sinica

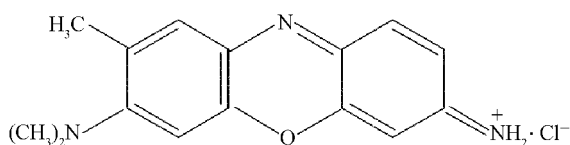


图1 灿烂甲酚蓝(BCB)的分子结构式
Fig.1 The molecular structure of brilliant cresyl blue (BCB)

杂交指示剂,考察它在 DNA 修饰电极上的电化学生行为. BCB 是一种吩噻嗪类小分子化合物,具有环状平面结构,其分子结构式如图 1 所示.

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

LK 98A 微机电化学分析仪(天津兰立科化学电子高技术有限公司),三电极系统:DNA 修饰或未修饰的金电极为工作电极($\phi=2.0$ mm),饱和甘汞电极(SCE)为参比电极,铂丝电极为对电极.

巯基乙醇(天津市光复化工研究所),灿烂甲酚蓝(BCB,中国医药集团上海化学试剂公司),鲑鱼精 dsDNA (Sigma 公司),乙基-(3-二甲基氨丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC, Sigma 公司),*N*-羧基琥珀酰亚胺(NHS,中国医药集团上海化学试剂公司);所用试剂均为分析纯,实验用水均为二次石英蒸馏水.单链 DNA(ssDNA)是根据 DNA 的热变性性质,将鲑鱼精 dsDNA 溶液在沸水中加热 10 min 后快速冷却制得.

1.2 实验方法

将金电极用 Al_2O_3 悬浊液抛光,然后依次用丙酮、乙醇、二次蒸馏水超声 5 min,使金电极表面成光滑镜面.将已抛光的裸金电极浸入 $10.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 巯基乙醇溶液中,在室温条件下避光组装 24 h,取出后在水中浸泡 20 min,用以除去电极表面物理吸附的巯基乙醇分子,即得到巯基乙醇自组装膜修饰电极(SAM).将 SAM/Au 电极浸入含 $5.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDC 和 $8.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NHS 的 PBS 溶液中活化 30 min,然后浸入 $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ssDNA 或 dsDNA ($20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS, $\text{pH}=7.0$)溶液中 25°C 恒温过夜,电极取出后用二次蒸馏水淋洗,所得电极为 ssDNA/Au 或 dsDNA/Au 电极.循环伏安法都在含有 BCB 的 B-R(Britton-Robinson)缓冲溶液($\text{pH}=6.5$)中以 $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ 的扫描速率进行,扫描范围为 $0 - -0.6 \text{ V}$.

2 结果与讨论

2.1 灿烂甲酚蓝与 DNA 在溶液中的电化学生行为

图 2 为在 BCB 溶液中分别加入单、双链 DNA 后得到的循环伏安图.在实验条件下,BCB 在裸金电极上的 CV 曲线如曲线 a 所示,出现 2 对氧化还原峰,与文献结果一致^[12],其中前一对峰的峰电流大,峰形良好,以其为研究对象.当在 BCB 溶液中加入 $200.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ssDNA 或 dsDNA 后,其 CV 图分别如曲线 b 和 c 所示,算出它们的阳极峰电流分别降低了 24.73% 和 40.53%,阴极峰电流分别降低了 20.97% 和 68.42%.当 BCB 结合 DNA 后,其活性中心被包藏,不易接触到电极表面,因而使溶液中的 BCB 表观浓度减少,峰电流降低.加入 dsDNA 后峰电流降低幅度明显较加入 ssDNA 后的大,表明 BCB 分子与 dsDNA 和 ssDNA 作用力大小不同,并且它与 dsDNA 的结合能力更强,这就使得 BCB 对 dsDNA 和 ssDNA 的结合能力具有选择性,因此 BCB 是一种潜在的电化学杂交指示剂.

2.2 BCB 在不同 DNA 修饰电极上的电化学生行为

图 3(a, b, c)分别为 $2.0\times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BCB 在裸金电极, ssDNA 修饰电极和 dsDNA 修饰电极上的循环伏安曲线.在裸金电极上,BCB 的式电位 $E^{\circ} = -0.208 \text{ V}$, $\Delta E_p = 0.032 \text{ V}$;在 ssDNA 修饰电极上 $E^{\circ} = -0.215 \text{ V}$, $\Delta E_p = 0.028 \text{ V}$,式电位的负移表明 BCB 与电极表面 ssDNA 存在静电作用,使电极表面的 BCB 浓度有所增加,峰电流随之增加.在 dsDNA 修饰电极表面 $E^{\circ} = -0.215 \text{ V}$, $\Delta E_p = 0.024 \text{ V}$,与 ssDNA 修饰电极相比, E° 保持不变,但峰电流明显增加,说明 BCB 与吸附态 dsDNA 的作用力更强,富集在 dsDNA 修饰电极上的 BCB 浓度更高,相应的峰电

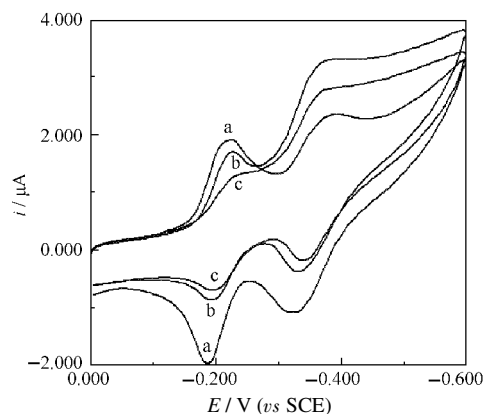


图2 裸金电极在不同溶液中的循环伏安曲线
Fig.2 Cyclic voltammograms of Au electrode in different solutions

scan rate: $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$; (a) $1.5\times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BCB;
(b) $1.5\times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BCB+ $200.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ssDNA;
(c) $1.5\times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BCB+ $200.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ dsDNA

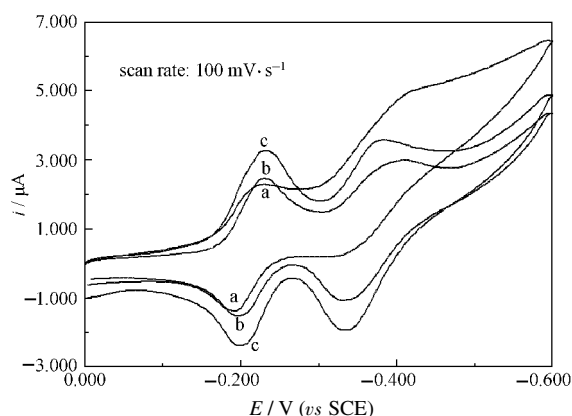


图3 BCB在裸金电极(a)、ssDNA/Au (b)和dsDNA/Au (c)电极上的循环伏安曲线

Fig.3 Cyclic voltammograms of BCB on bare Au (a), ssDNA/Au (b), and dsDNA/Au (c) electrodes

流增加. 式电位 E^0 不变说明 BCB 与 dsDNA 不仅存在静电作用而且存在着嵌插作用, 因为若只有静电作用存在的话, 在 dsDNA 上静电作用会更强, 峰电位将会负移更多, 而嵌插作用的特征是使峰电位正移^[13], 因此两者共同作用的结果使式电位不发生变化.

2.3 扫描速率对灿烂甲酚蓝溶液峰电流的影响

分别在裸金电极、ssDNA/Au 和 dsDNA/Au 修饰电极上考察了扫描速率对峰电流的影响. 随着扫描速率的增加, 阴极峰和阳极峰电流都逐渐增大, 以 $\lg i_p$ 对 $\lg v$ 作图, 得三条直线, 结果如图 4 所示, 其方程分别为 $\lg i_{pa} = 0.71 \lg v + 0.76$ ($R = 0.998$, 直线 a), $\lg i_{pb} = 0.76 \lg v + 1.01$ ($R = 0.999$, 直线 b), $\lg i_{pc} = 0.84 \lg v + 1.12$ ($R = 0.997$, 直线 c), 直线的斜率分别为 0.71、0.76 和 0.84, 表明随着修饰的进行斜率逐步增加; 由于斜率均在

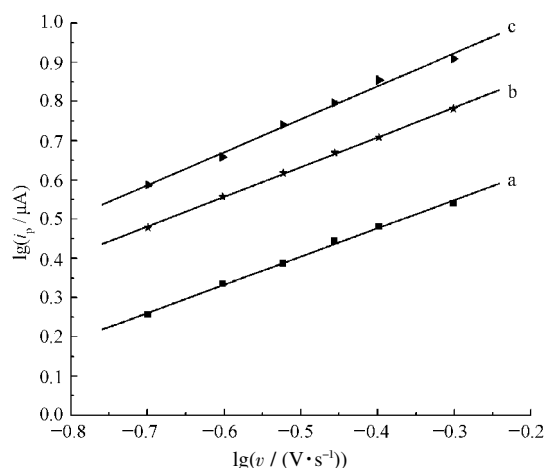


图4 BCB在裸金电极(a)、ssDNA/Au (b)和dsDNA/Au (c)上还原峰电流与扫速的关系

Fig.4 Plots of peak currents vs scan rate at bare Au (a), ssDNA/Au (b), and dsDNA/Au (c) electrodes

0.5 到 1 之间, 说明 BCB 在三种电极上的电极反应均为扩散与吸附联合控制的过程, 而且吸附控制在 dsDNA/Au 上所起的作用要大于其在 ssDNA/Au 上的贡献. 这说明 BCB 与 dsDNA 不仅存在着静电作用而且存在着嵌插作用, 吸附控制在 dsDNA 电极表面起着主要贡献.

2.4 吸附常数的求解

考察了不同浓度的 BCB 溶液在 ssDNA/Au 和 dsDNA/Au 电极上的循环伏安行为. 发现随着 BCB 浓度的增加, 峰电流均逐渐增大并趋向于饱和, 其形状符合 Langmuir 吸附曲线. Langmuir 吸附公式可改写成如下表达式:

$$\frac{c}{i_p} = \frac{1}{K i_{p,max}} + \frac{c}{i_{p,max}}$$

式中 i_p 、 $i_{p,max}$ 、 c 和 K 分别是峰电流、最大峰电流、BCB 浓度和 BCB 在电极上的吸附常数. 改变 BCB 的浓度 c 值得到相应的 i_p 值, 根据公式可以得到 c/i_p 与 c 的关系, 结果如图 5 所示, 由直线的截距可以分别求出 BCB 在 ssDNA/Au 上的吸附常数为 $1.67 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 而在 dsDNA/Au 上的吸附常数为 $3.22 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$. 该结果表明 BCB 在 dsDNA/Au 上具有更大的结合力度.

2.5 电化学交流阻抗谱对修饰电极的表征

以 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 为探针, 考察了其在不同 DNA 修饰电极上的交流阻抗行为, 结果如图 6 所示. 裸金电极的阻抗谱图基本上是一条直线, 高频区 R_{ct} 很小, 说明 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 溶液很容易到达电极表面, 电极上不存在阻挡电子传递的物质. 在金电极表面修饰了一层 ssDNA 后, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 的

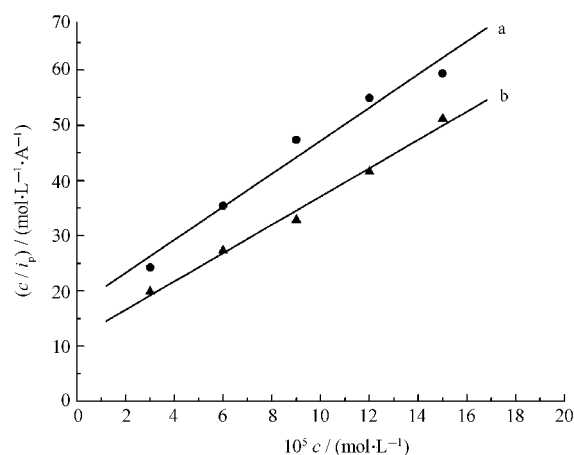


图5 ssDNA/Au (a)和dsDNA/Au (b)上 c/i_p 与 c 的关系
Fig.5 Relationship of c/i_p with c on ssDNA/Au (a) and dsDNA/Au (b) electrodes

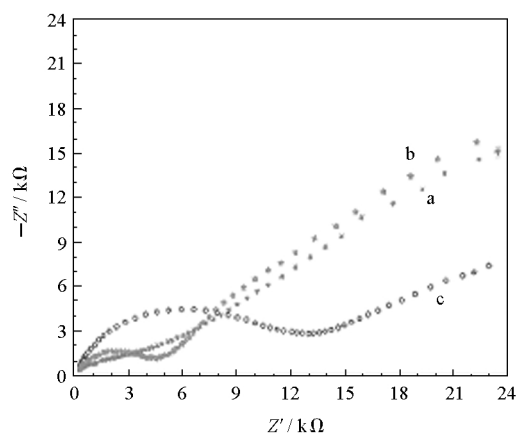


图6 裸金电极(a)、ssDNA/Au (b)、dsDNA/Au (c)在 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 中的阻抗谱图
 Fig.6 Nyquist AC impedance frequency spectra of bare gold electrode (a), ssDNA/Au (b), and dsDNA/Au (c) in $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ solution

电荷传递电阻 R_{ct} 显著增大,充分说明 ssDNA 已被固定到电极表面,ssDNA 骨架上的负电荷阻碍了探针分子的电子传输,从而引起了 R_{ct} 增大.而在金电极表面修饰了一层 dsDNA 后的 R_{ct} 相对于 ssDNA 的变大了,表明 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 在 dsDNA/Au 电极表面的电荷传递速率比在 ssDNA/Au 电极表面上要慢.原因是 dsDNA 的表面结构比 ssDNA 更有序更稳定,且表面负电荷更多,所以它对 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 的电荷传递阻碍更大.

3 结论

利用巯基乙醇自组装膜将单双链 DNA 固定于电极表面形成 DNA 修饰电极,考察了 BCB 在

DNA 修饰电极上的电化学行为. BCB 与电极表面的 ssDNA 和 dsDNA 具有不同的结合模式,并表现出不同吸附常数,表明 dsDNA 双螺旋结构对 BCB 有更强的亲和力,两者的结合强度更大,BCB 对单、双链 DNA 的区分作用说明 BCB 可以作为一种合适的电化学杂交指示剂.

References

- Xu, X. H.; Bard, A. J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, *117*(9): 262
- Lu, X. J.; Ju, H. X. *Chin. J. Anal. Chem.*, **2003**, *31*(1): 110 [陆晓军, 鞠焜先. 分析化学, **2003**, *31*(1): 110]
- Pang, D. W.; Yan, W. *Chem. J. Chin. Univ.*, **2001**, *22*(3): 389 [庞代文, 颜蔚. 高等学校化学学报, **2001**, *22*(3): 389]
- Jiao, K.; Zhang, X. Z.; Xu, G. Y.; Sun, W. *Acta Chim. Sin.*, **2005**, *63*(12): 1100 [焦奎, 张旭志, 徐桂云, 孙伟. 化学学报, **2005**, *63*(12): 1100]
- Yang, L. J.; Peng, T. Z. *Chin. J. Anal. Chem.*, **2001**, *29*(3): 355 [杨丽菊, 彭图治. 分析化学, **2001**, *29*(3): 355]
- Lin, L.; Jiang, L. *Chemistry*, **2001**, *5*: 261 [林琳, 江龙. 化学通报, **2001**, *5*: 261]
- Palecek, E. *Anal. Biochem.*, **1988**, *170*: 421
- Fu, C. G.; Su, C. H.; Shan, R. F. *Acta Phys. -Chim. Sin.*, **2004**, *20*(2): 207 [傅崇刚, 苏昌华, 单瑞峰. 物理化学学报, **2004**, *20*(2): 207]
- Millan, K. M.; Mikkelsen, S. R. *Anal. Chem.*, **1993**, *65*: 2317
- Ju, H. X.; Ye, Y. K.; Zhao, J. H. *Anal. Biochem.*, **2003**, *313*: 255
- Zhao, Y. D.; Pang, D. W.; Hu, S.; Wang, Z. L.; Cheng, J. K.; Dai, H. P. *Talanta*, **1999**, *49*: 751
- Liu, Y. M.; Wang, E. K. *Chin. J. Anal. Chem.*, **1985**, *13*: 109 [刘雁鸣, 汪尔康. 分析化学, **1985**, *13*: 109]
- Carter, M. T.; Rodriguez, M.; Bard, A. J. *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, *111*(24): 8901