

铂电极表面生物素亲和素固载单链 脱氧核糖核酸的电化学传感器

王保珍 杜晓燕* 郑晶 金滨锋

(哈尔滨医科大学公共卫生学院, 哈尔滨 150001)

摘要 通过直接吸附将亲和素固定在 Pt 电极表面, 联于生物素标记的脱氧核糖核酸 (DNA) 探针, 制备了电化学基因传感器, 建立了 Pt 电极表面修饰单链脱氧核糖核酸 (ssDNA) 的方法。修饰电极与待测溶液中人工合成的转基因食品中常有的花椰菜花叶病毒 35S 启动子 (CaMV 35S) 或根癌农杆菌终止子 (NOS) DNA 片段进行杂交, 以邻菲罗林钴络合物 $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ 为杂交指示剂, 循环伏安法测量, 通过杂交前后指示剂峰电流的变化检测 DNA 杂交的量。研究了电极修饰、杂交反应及测量的适宜条件, 在优化实验条件下, 峰电流的差值与 DNA 杂交量之间有良好的线性关系, 相关系数 $r=0.9996$ 。杂交后的电极经热变性再生, 可重复使用多次。

关键词 电化学脱氧核糖核酸 (DNA) 传感器, 亲和素-生物素体系, 转基因食品, 循环伏安法, 化学修饰电极

1 引言

电化学 DNA 生物传感器结合了 DNA 序列杂交的特异性和电化学测量灵敏、简单等特性, 而备受关注^[1-3]。构建 DNA 传感器应先将 DNA 探针固定到载体表面, 然后通过杂交反应检测其互补链片段。因此, ssDNA 在电极表面的固定化是电化学 DNA 传感器的关键步骤。目前 DNA 探针的固定方法主要有表面富集法^[3]、共价键合法^[1,4,5]、自组装膜法^[2]、生物素亲和素方法^[6]等。刘盛辉等^[5]将石墨电极表面硅烷化导入氨基, 然后用碳二亚胺 (EDC) 作偶联活化剂, 在电极表面固定单链 DNA。郑赛晶等^[7]采用微孔穴充石蜡石墨电极固载 ssDNA。黄海珍等^[8]对 DNA 探针的固定方法作了详细评述。

生物素 (biotin) 和亲和素 (avidin) 之间具有高度亲和性及多级放大效应, 而且亲和素可以直接不可逆地吸附到 Au, Ag, Pt 等电极表面形成单分子层。Du 等^[9,10]曾利用亲和素这一特性, 成功地将该体系用于 Pt 电极表面酶的固定化。高志贤等^[6]采用巯基自组装技术, 通过碳二亚胺和 N-羟基琥珀酸亚胺偶联剂将亲和素固定于金电极表面, 联于生物素标记的 ssDNA 片段。本研究以 Pt 电极为基底电极, 首先将亲和素直接修饰在 Pt 电极上, 然后利用亲和素-生物素体系分别将转基因食品中常含有的花椰菜花叶病毒启动子 (CaMV35S) 和根癌农杆菌终止子 (NOS) 两段 ssDNA 片段固定在电极表面, 研制了电化学 DNA 传感器, 对实验条件进行了探索, 以差分定量法测定目的基因, 对人工合成及大豆蛋白粉中转基因成分 DNA 片段进行了识别测定。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

CHI 660A 电化学分析仪 (上海辰华仪器有限公司); 恒温培养箱 (上海跃进医疗器械一厂); 超声波细胞粉碎机 (宁波新芝科器研究所); 工作电极 (自制 Pt 电极, $d=3\text{ mm}$)、参比电极 (饱和甘汞电极, SCE) 和对电极 (铂丝)。

生物素标记探针: 花椰菜花叶病毒 35S 启动子 A 5'-biotin-TGATGGCA TTTGTAGGAGC-3'; 根癌农杆菌 NOS 终止子 B 5'-biotin-CAAGACCGGCAACA GGA TTC-3'; 目的基因序列: 花椰菜花叶病毒 35S 启动子 A 5'-GCTCCTACAAA TGCCATCA-3'; 根癌农杆菌 NOS 终止子 B 5'-GAA TCCTGTTGCCGGTCTTG-3' (上海捷倍思基因技术有限公司合成, PAGE 纯化); 亲和素 (AMRESCO 公司); 2 mmol/L $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 + 0.1\text{ mol/L KCl}$ 溶液; D-PBS 缓冲液 (Dulbecco's phosphate-buffered saline pH 7.2); TE (Tris-ED-

TA)缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0 + 1 mmol/L EDTA);杂交反应液: 2 ×SSC反应液 (saline-sodium citrate buffer 300 mmol/L NaCl + 30 mmol/L $\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ pH 7.0);杂交清洗液 (2 ×SSC-0.1% SDS, 0.2 ×SSC-0.1% SDS), $\text{Co}(\text{phen})_3(\text{ClO}_4)_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 按文献 [11]方法合成,使用前用二次蒸馏水重结晶 3次。试剂均为分析纯,水为二次蒸馏水。高纯 N_2 ,使用前通 N_2 15 min除氧,实验中维持 N_2 气氛。

2.2 实验方法

2.2.1 Pt电极预处理 用 Al_2O_3 悬浮液在鹿皮上抛光 Pt电极,用水超声清洗 2次,每次 5 min,然后将电极放在 2 mmol/L $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ + 0.1 mol/L KCl溶液中进行循环伏安扫描 ($v=0.05$ V/s),直至 E_p 85 mV。

2.2.2 ssDNA在铂电极表面的固定化 将抛光后的 Pt电极浸入 200 μL 亲和素溶液 (1 g/L)中,室温放置 50 min,取出晾干,再重复一次。用 D-PBS溶液反复清洗 5 min,亲和素即修饰在电极表面。再将生物素标记的探针溶液 (100 mg/L) 25 μL 滴加在电极表面,室温下自然干燥,然后用 TE液反复清洗电极 5~7 min,以去除未结合的单链 DNA。制备好的电极放在 4 冰箱保存备用。

2.2.3 ssDNA电极杂交 将 ssDNA修饰电极浸入含一定浓度目的基因的 2 ×SSC杂交液中,置于恒温培养箱 50 杂交反应 1 h,取出电极,用等温的 2 ×SSC-0.1% SDS和 0.2 ×SSC-0.1% SDS分别清洗电极各 5~7 min,再用二次蒸馏水清洗 1 min,用于检测。

2.2.4 电化学检测 杂交后的电极作为工作电极,饱和甘汞电极为参比电极,铂丝为对电极,置于含一定浓度 $\text{Co}(\text{phen})_3^{3+}$ 5 mmol/L Tris-HCl + 5 mmol/L NaCl缓冲液 (pH 7.05)中,1 min (0.5 ~ -0.1 V作循环伏安扫描,记录杂交前后 $\text{Co}(\text{phen})_3^{3+}$ 的还原峰电流值,根据杂交前后峰电流的变化测定 DNA含量。

2.2.5 样品 DNA提取 采用 SDS提取法^[12],DNA浓度测定采用紫外分光光度法。

3 结果与讨论

3.1 DNA探针的固定化和杂交

在裸露的铂电极上, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 的氧化还原峰尖锐且电位差小,亲和素通过直接吸附修饰在电极表面。从图 1可见,铂电极表面修饰亲和素后, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 的氧化还原峰电流明显降低,电位差明显增大,说明电极表面吸附的亲和素单分子层,阻碍了 $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 向电极表面的进一步扩散。

图 2中 a、b分别显示了 $\text{Co}(\text{phen})_3^{3+}$ 在 ssDNA修饰电极上杂交前后的氧化还原电流。由图中可见,杂交之前,只有少量 $\text{Co}(\text{phen})_3^{3+}$ 可与电极表面的单链 DNA (ssDNA)相互作用,静电吸附到电极表面,氧化还原电流很小。杂交后,由于 $\text{Co}(\text{phen})_3^{3+}$ 与双链 DNA (dsDNA)有很强的相互作用,大量富集

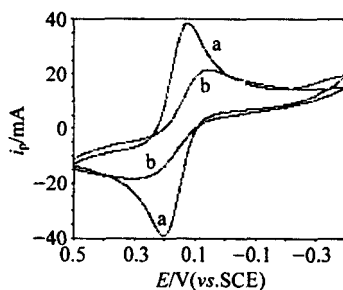


图 1 2 mmol/L $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 的循环伏安图

Fig 1 Cyclic voltammograms for 2 mmol/L $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$

a 裸电极 (bare Pt electrode); b 亲和素修饰电极 (electrode modified with avidin); $v=50$ mV/s

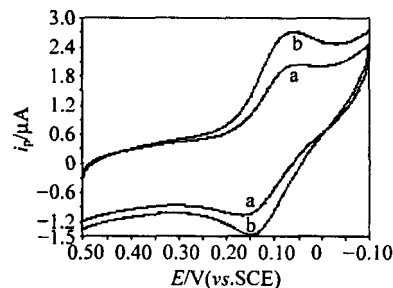


图 2 $\text{Co}(\text{phen})_3^{3+}$ 的循环伏安图

Fig 2 Cyclic voltammograms for $\text{Co}(\text{phen})_3^{3+}$

a 单链 DNA (ssDNA); b 双链 DNA (dsDNA); 靶基因 (target DNA): 1.4×10^{-7} mol/L; 杂交温度 (hybridization temperature): 50 ; v : 100 mV/s $\text{Co}(\text{phen})_3^{3+}$: 100 $\mu\text{mol/L}$. phen: 1,10-phenanthroline; DNA: deoxyribonucleic acid.

到电极表面,因而 $\text{Co}(\text{phen})_3^{3+}$ 的氧化还原峰电流明显增大。在较低的离子强度下, $\text{Co}(\text{phen})_3^{3+}$ 主要以

静电方式与 DNA 相互作用,在此条件下,同样长度的 DNA 链可以结合更多的指示剂分子,因而可以大大提高检测的灵敏度^[13]。故实验采用较低离子强度下进行电化学检测。

3.2 杂交温度的影响

DNA 的杂交反应对温度非常敏感。当温度过低时,溶液中目的基因的扩散速度缓慢,影响了互补链间杂交反应的进行;当温度过高时,又会使杂交后的双链发生热变性,且变性程度随温度的升高而加剧。实验表明,杂交反应温度在比理论 T_m 值约低 5 时反应最佳。由表 1 可知,40 时杂交反应缓慢,DNA 杂交的量甚微;随温度的升高,DNA 杂交的量增多,杂交前后指示剂还原峰电流差值增大,50 时达最大值;温度再高,杂交后的 DNA 部分发生热变性,峰电流减小。因而探针 A 的最佳杂交温度为 50。

表 1 杂交温度对峰电流的影响

Table 1 Effect of hybridization temperature on peak current					
杂交温度 Hybridization $T/$	40	45	50	55	60
峰电流差值 i_p/μ	0.012	0.085	0.201	0.077	0.017

Co(phen)₃³⁺: 80 μ mol/L; 杂交时间 (hybridization time): 60 min; v : 100 mV/s

3.3 杂交时间和 pH 值的影响

杂交时间亦是影响杂交程度的重要因素之一。时间太短,杂交不充分,指示剂还原峰电流太小;杂交时间过长,DNA 的杂交量达到饱和,峰电流的改变趋于稳定。如图 3 所示,60 min 后杂交达饱和,峰电流的改变趋于稳定,故探针 A 的最佳杂交时间取 60 min。

杂交溶液过酸或过碱均影响 DNA 的杂交反应,从而降低检测灵敏度。考虑到生理条件及亲和素-生物素体系的稳定性要求,杂交液 pH 值取 7.0。

3.4 指示剂浓度及检测 pH 值对峰电流的影响

随指示剂浓度的增加,指示剂与 DNA 静电作用的量亦增加,当指示剂浓度大到一定程度时,与 DNA 作用的量趋于稳定,实验选取指示剂浓度在 50 ~ 100 μ mol/L 之间进行测定。

指示剂底液的 pH 值在 6.60 ~ 7.40 之间对指示剂还原峰电流的大小没有明显的影响,但 pH 值过低时会影响生物素-亲和素体系的稳定性,从而影响传感器的再生及使用寿命。鉴于此,检测 pH 值以不低于 7.0 为宜。本实验检测 pH 值取 7.05。

3.5 线性范围及检出限

在 2 mL 2 × SSC 中加入不同浓度的目的 ssDNA (A 19-mer),按上述最佳条件进行杂交并循环伏安检测,ssDNA 浓度在 7.0×10^{-8} ~ 2.3×10^{-7} mol/L 之间与检测信号有良好的线性关系。回归方程为: $y = 1.16x + 0.137$,相关系数为 $r = 0.9996$ 。检出限为 1×10^{-8} mol/L。实验运用该方法对探针 B 进行了成功固定并对目的基因 (B 20-mer) 进行了杂交识别,效果良好。

3.6 传感器的再生

将杂交后的电极置于沸水中,变性洗脱 4.5 min,然后迅速放入冰水中冷却,传感器可重复使用。电极至少可重复使用 6 次。再生 6 次之后,指示剂峰电流差值下降较快,可能由于电极上固定化 ssDNA 有脱落。

3.7 转基因大豆蛋白粉 DNA 片段识别

为了验证该方法的专一性,对含有转基因成分的大豆蛋白粉样品 (中国检验检疫科学研究院) 和非转基因大豆 (市售) 样品进行 DNA 提取, $A_{260}/A_{280} = 1.8 \sim 2.0$ 。提取的 DNA 在 100 煮沸 5 min,解开双链,按上述方法进行电极杂交反应,并进行伏安测定。结果显示,含有转基因成分的大豆蛋白粉样品在电极上有良好的电化学响应,而市售非转基因大豆样品则没有电极响应。证明该方法能够有效识别 DNA 片段。

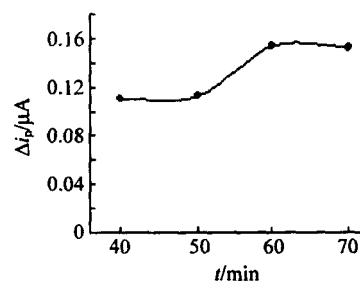


图 3 杂交时间对峰电流的影响

Fig 3 Effect of hybridization time on the peak current

杂交温度 (hybridization temperature): 50 ;
 v : 100 mV/s; Co(phen)₃³⁺: 50 μ mol/L。

References

- 1 Millan KM, Sarullo A, Mikkelsen S R. *Anal Chem.*, **1994**, 66: 2943 ~ 2948
- 2 Hashimoto K, Ito K, Ishimori Y. *Anal Chem.*, **1994**, 66: 3830 ~ 3833
- 3 Wang J, Palecek E, Nielsen P E, Rivas G, Cai X, Shiraishi H, Dontha N, Luo D, Farias P A M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118: 7667 ~ 7670
- 4 Fang Yuzhi(方禹之), Liu Shenghui(刘胜辉), He Pingang(何品刚). *Chinese J. Anal Chem.* (分析化学), **1996**, 17 (8): 1222 ~ 1224
- 5 Liu Shenghui(刘胜辉), Sun Changlin(孙长林), He Pingang(何品刚), Fang Yuzhi(方禹之). *Chinese J. Anal Chem.* (分析化学), **1999**, 27 (2): 130 ~ 134
- 6 Gao Zhixian(高志贤), Chao Fuhuan(晁福寰), Wang Hongyong(王红勇), Fang Yanjun(房彦军), Ning Baoan(宁保安). *Progress in Biochemistry and Biophysics* (生物化学与生物物理进展), **2002**, 29 (3): 454 ~ 459
- 7 Zheng Saijing(郑赛晶), Lin Xiangqin(林祥钦), Yin Yimei(尹屹梅). *Acta Chimica Sinica* (化学学报), **2002**, 60 (10): 1828 ~ 1833
- 8 Huang Haizhen(黄海珍), Yang Xiurong(杨秀荣). *Chinese J. Anal Chem.* (分析化学), **2002**, 30 (4): 491 ~ 497
- 9 Du X, Anzai J, Osa T, Motohashi R. *Electroanalysis*, **1996**, 8: 813 ~ 816
- 10 Anzai J, Kobayashi Y, Suzuki Y, Takeshita H, Chen Q, Osa T, Hoshi T, Du X. *Sensors and Actuators B*, **1998**, 52: 3 ~ 9
- 11 Dollimore L S, Gillard R D. *J. Chem. Soc Dalton Trans*, **1973**: 933 ~ 940
- 12 Wang Zhen(王珍), Fang Xuanjun(方宣均). *Molecular Plant Breeding* (分子植物育种), **2003**, 1 (2): 281 ~ 288
- 13 Pang D, Abruna H D. *Anal Chem.*, **1998**, 70 (15): 3162 ~ 3169

Electrochemical Sensor Based on Immobilization of Single Stranded Deoxyribonucleic Acid on Pt Electrode Surface by Avidin-biotin System

Wang Baozhen, Du Xiaoyan^{*}, Zheng Jing, Jin Bin Feng
(Public Health College, Harbin Medical University, Harbin 150001)

Abstract An electrochemical sensor for detection of specific deoxyribonucleic acid (DNA) sequences based on ssDNA modified Pt electrode by avidin-biotin has been developed. The method is simple, convenient, reagent-saving and practical for DNA studies. The experimental steps are as follows: () avidin was immobilized on the Pt electrode surface via direct adsorption, () biotinylated ssDNA was modified onto the electrode surface by avidin-biotin system, () the ssDNA-electrode was immersed into 2 mL of the 2 × saline-sodium citrate (SSC) buffer containing complementary DNA, and the hybridization reaction was carried out at certain temperature, () the electrode was immersed into a $\text{Co}(\text{phen})_3^{3+}$ solution (5 mmol/L Tris-HCl + 5 mmol/L NaCl pH 7.05) and detected voltammetrically. The immobilized probes were specific for most inserted sequences in genetically modified food: the promoter 35 S or the terminator NOS. The sensor signal dependent on external conditions (pH, temperature, the time of hybridization and immobilization) were studied for clarification of their effect on the assay and to find the optimum condition for measurements. The results showed that it was better for avidin to be adsorbed onto the electrode surface twice, 50 minutes every time and the optimum conditions of hybridization reaction were pH 7.0, 50, 60 min. Under optimum conditions, the sensor's output signals present primarily a relation of linearity with the concentration of complementary DNA sequences between 7.0×10^{-8} mol/L and 2.3×10^{-7} mol/L. The linear equation of probe 35 S was $y = 1.16x + 0.137$, and the correlation coefficient was 0.9996. The sensor can be reused over 6 times by electrode regeneration.

Keywords Electrochemical deoxyribonucleic acid sensor, avidin-biotin system, genetically modified food, cyclic voltammetry, chemically modified electrode