

DNA 化学损伤的电化学检测

夏前正¹, 刘姝娜², 蔡称心²

(1 江苏省淮阴卫生学校, 江苏 淮安 223300)

(2 南京师范大学化学与环境科学学院, 江苏省生物功能材料重点实验室, 分子医学生物技术江苏省重点实验室, 江苏 南京 210097)

[关键词] 碳纳米管, DNA, DNA 损伤, 电化学检测

[中图分类号] O646.1 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2007)04-0119-03

0 引言

DNA 是重要的遗传物质, 在机体的生长过程中, 它不可避免地受到各种因素的作用而产生损伤, 从而直接影响 DNA 的复制、转录和蛋白质的合成, 进而影响细胞生长、发育、遗传、代谢和繁殖等生命基本过程, 还会造成细胞突变、癌变、老化甚至死亡. 因此, 对 DNA 损伤及其检测方法的研究不仅有助于更好地了解生命体的基本过程, 而且还可为疾病的临床诊断、治疗甚至新的基因治疗药物的发现提供理论基础. 检测 DNA 损伤的方法主要有高效液相色谱法、酶联免疫法、气相色谱-质谱法、毛细管电泳法以及电化学方法等^[1-3]. 利用色谱法 (包括 HPLC、GC) 和毛细管电泳法检测 DNA 损伤后的具体产物需对实际样品进行复杂的预处理 (如一般需对样品进行衍生化后才能测量), 费时很长, 而且所需的检测仪器 (如质谱) 昂贵; 而 ELISA 法由于交叉反应的存在, 导致检测结果往往不准确, 从而限制了这些方法的实际使用. DNA 损伤的电化学检测是由 Palacek 等^[4]最先提出的一种基于 DNA 中鸟嘌呤和腺嘌呤电化学氧化的检测方法, 它具有快速、方便以及所需仪器价廉等优点. Palacek 等^[4]发现吸附在 Hg 电极上有损伤的 DNA 能产生比没有损伤 DNA 更大的伏安峰电流, 从而可用于区别出 DNA 是否有损伤. 其不足之处是所用 Hg 电极有毒, 而且所需的检测电位较高 (一般在 0.7~1.3 V, vs SCE), 易被氧化物质所干扰.

本文报道一种新的 DNA 嵌入试剂, 1-苯基偶氮-2-萘酚 (PN) 与 DNA 的相互作用及用于 DNA 损伤电化学检测的探针分子. 本文方法的优点在于 PN 的电化学反应可逆, 其式量电位 $E'^0 \approx 0.1 \text{ V}$ (vs SCE, pH 5.5), 能有效降低其它电活性物质的干扰.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

小牛胸腺 ds-DNA、氧化苯乙烯 (97%, Aldrich) 未经进一步处理直接使用; 单链 DNA (ss-DNA) 的获得方法同 [5]. PDDA (20% 水溶液, Aldrich) 在使用前用水稀释至 5% (质量分数); 1-苯基偶氮-2-萘酚 (PN, 97%, Aldrich) 在使用前用水重结晶两次; 单壁碳纳米管 (CNT, 直径小于 2 nm, 纯度大于 90%, 深圳市纳米港有限公司) 使用前在 HNO_3 (3 mol/L) 中于 60℃ 回流 10 h. 其它试剂均为分析纯试剂, 醋酸缓冲溶液 (10 mmol/L, 含 50 mmol/L NaCl, pH 5.5) 由 NaAc 和 HAc 按比例用二次蒸馏水配制而成.

紫外可见 (UV-Vis) 和拉曼 (Raman) 光谱实验分别在 Cary 5000 UV-Vis-NIR 光谱仪 (Varian, USA) 和 Labram HR 800 UV 拉曼光谱仪 (Jobin Yvon) 上进行. 循环伏安实验在 CHI 660B 电化学工作站 (上

收稿日期: 2007-09-10 修回日期: 2007-10-23

基金项目: 国家自然科学基金 (20373027, 20673057, 20773067)、“新世纪优秀人才支持计划” (NET-06-0508)、江苏省自然科学基金 (BK2005138)、分子医学生物技术江苏省重点实验室基金 (MMBK05001) 资助项目.

作者简介: 夏前正 (1966-), 高级讲师, 主要从事化学教育的教学与研究. E-mail: hywxqx@126.com

通讯作者: 蔡称心 (1966-), 教授, 主要从事物理化学的教学和生物电化学及生物燃料电池的教学与研究. E-mail: cxc@njnu.edu.cn

海辰华)上进行,螺旋状铂丝作辅助电极,饱和甘汞 (SCE)电极为参比电极;在进行电化学实验前,溶液用高纯氮除氧至少 30 min 所有电化学实验均在 (37±1)℃下进行.

1.2 DNA 在 CNT 表面的固定及 DNA—PDDA—CNT /GC 电极的制作

将 2 mg CNT 超声分散在 1 mL 5% PDDA 水溶液中,12 h 后离心分离,室温晾干后得到 PDDA—CNT. 将 1 mg PDDA—CNT 分散到含 2 mg/mL DNA 的醋酸缓冲溶液中,于 4℃下搅拌 10 h,带负电荷的 DNA 通过与带正电荷的 PDDA 之间的静电作用而固定到 CNT 表面,离心分离并用二次蒸馏水洗涤 3 次,得到 DNA—PDDA—CNT 纳米复合体.

将 2 mg DNA—PDDA—CNT 均匀地分散在 1 mL 醋酸缓冲溶液中,将 2 μL DNA—PDDA—CNT 的悬浊液滴加到 GC 电极表面,室温下待溶剂 (水)挥发后,得到 DNA—PDDA—CNT /GC 电极.

1.3 PN 与 DNA 的相互作用及氧化苯乙烯对 DNA 的化学损伤

将 DNA—PDDA—CNT /GC 电极浸入含 5 mmol/L PN 的醋酸缓冲溶液中约 5 min 后,即形成 PN—DNA—PDDA—CNT /GC 电极,取出,用二次蒸馏水仔细淋洗,然后再放入不含 PN 的醋酸缓冲溶液中 (pH 5.5),用循环伏安法考察 PN 与 DNA 的作用.

将 DNA—PDDA—CNT /GC 电极浸入含氧化苯乙烯 (20 μL/mL)的醋酸缓冲溶液中一段时间,使 DNA 产生损伤^[6],取出并冲洗后,再与 PN 作用,通过 PN 的电化学响应变化判断 DNA 的损伤及损伤的程度.

2 结果与讨论

2.1 谱学表征

自由状态 DNA 的 UV—Vis 特征吸收峰在 260 nm 处 (未示出); DNA—PDDA—CNT 的 UV—Vis 光谱曲线上也出现了一个类似的吸收峰,而且峰位置没有发生移动 (260 nm),只是峰强度有所降低,这是由于 DNA 浓度不一致所致. PDDA—CNT 的 UV—Vis 光谱图则表现为一光滑的曲线. 以上结果表明, DNA 已在 CNT 表面发生了吸附固定.

纯化的 CNT 的 Raman 光谱图上在 1 566 cm^{-1} 处出现一个对应于 CNT 表面石墨化结构碳的 Raman 吸收峰 (图 1a),而对应于无定型碳的 Raman 吸收 (一般在 1 350 cm^{-1} 附近)^[7]则没有出现,说明纯化能有效地除去 CNT 样品中无定型碳.当表面修饰 PDDA 和 DNA 后, CNT 的 Raman 吸收分别移至 1 576 (图 1b PDDA—CNT)和 1 582 cm^{-1} (图 1c DNA—PDDA—CNT);与修饰前相比,分别向高波数移动了 10 cm^{-1} 和 16 cm^{-1} ;而且, PDDA—CNT 和 DNA—PDDA—CNT 的谱图上分别在 1 342 cm^{-1} (图 1b)和 1 345 cm^{-1} (图 1c)处出现了 Raman 吸收峰. PDDA 在 896 1 329 1 448 和 1 557 cm^{-1} 等处出现了 Raman 吸收峰 (图 1插图,曲线 d); DNA 的 Raman 光谱图上显示出 785 1 241 1 260 1 334 1 371 1 485 1 580 和 1 670 cm^{-1} 等吸收峰 (图 1插图,曲线 e). 因此图 1b 和 1c 上新的 Raman 吸收峰可能是由于 PDDA、DNA 和 CNT 的 Raman 吸收相互叠加所导致的;也可能是由于 PDDA 和 DNA 在 CNT 表面吸附后,使 CNT 表面产生某些结构缺陷所致^[8]. G 峰的移动以及新峰的出现都说明有高分子化合物 (PDDA 和 DNA)在 CNT 表面发生了吸附.

2.2 PN 用于 DNA 损伤的电化学检测

PN—CNT /GC 电极的循环伏安曲线显示一对良好的氧化还原峰 (图 2b),而 CNT /GC 电极在相同条件下没有出现类似的伏安峰 (图 2a),只出现了很小的对应于 CNT 表面含氧功能团氧化还原反应的伏安峰,说明曲线 b 中的氧化还原峰是由 PN 发生电化学反应而产生的,对应于 PN 中 —C—OH 被氧化成 —C=O

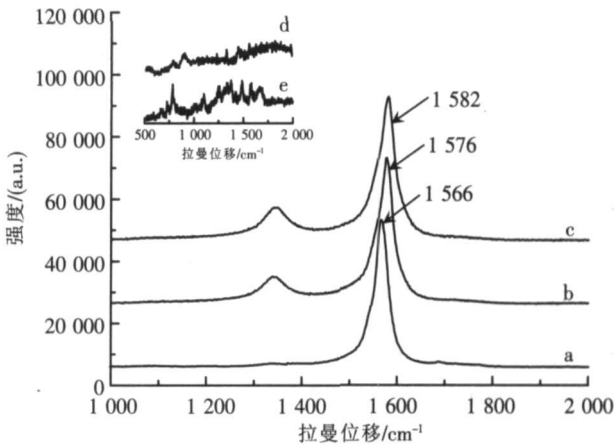


图 1 CNT (a), PDDA—CNT (b) 和 DNA—PDDA—CNT (c) 的 Raman 光谱图.插图是 PDDA(d)和 DNA(e)的 Raman 光谱图

Fig.1 Raman spectra of CNT (a), PDDA—CNT (b) and DNA—PDDA—CNT (c). The inset is the Raman spectra of PDDA (d) and DNA (e)

的反应. 在 50 mV/s 时, 氧化还原峰电位分别为 $E_{pa} = 195 \text{ mV}$, $E_{pc} = -10 \text{ mV}$, 式量电位 $E'^0 = 92.5 \text{ mV}$. 扫速 (v) 增加, 氧化还原峰电位几乎不移动, 而峰电流与 v 有线性关系, 与表面反应的理论要求一致.

PN-DNA-PDDA-CNT/GC 电极的循环伏安曲线上也表现出一对氧化还原峰 (图 2c), 峰电位分别为 $E_{pa} = 218 \text{ mV}$, $E_{pc} = 32 \text{ mV}$, 式量电位 $E'^0 = 125 \text{ mV}$; 与 PN-CNT/GC 电极相比, 氧化和还原峰电位向正方向分别移动了 23 和 42 mV, E'^0 值正移了 32.5 mV, 说明 PN 与 DNA 之间的作用方式是嵌入作用^[9].

将 DNA-PDDA-CNT/GC 电极在氧化苯乙烯溶液 ($20 \mu\text{L/mL}$) 中化学损伤 10 min 后, 再与 PN 作用, 所形成电极的伏安峰电流大为减小 (图 2d), 只有曲线 c 的一半, 表明 DNA 损伤后与 PN 的结合能力下降, 这一特性说明 PN 的电化学响应可被用于对 DNA 化学损伤的检测. 如果将氧化苯乙烯换成相同浓度的甲苯, 重复上述实验, 则 PN 的伏安峰电流几乎没有变化 (未示出), 说明氧化苯乙烯的类似物甲苯对 DNA 没有化学损伤作用.

当损伤时间固定, PN 伏安峰电流随氧化苯乙烯浓度的增加而急剧下降; 但当氧化苯乙烯浓度达到 $20 \mu\text{L/mL}$ 后, PN 峰电流几乎不再下降. 当保持氧化苯乙烯浓度为 $20 \mu\text{L/mL}$ 时, PN-DNA-PDDA-CNT/GC 电极的峰电流随损伤时间的增加而线性下降 (图 3a), 说明 DNA 的损伤程度随损伤时间的延长而增加. 以上结果表明, 用 PN 作探针分子, 不仅可以判断 DNA 有无损伤, 而且还可检测 DNA 的损伤程度. 如用甲苯与 DNA 作用, 则 PN 的峰电流随作用时间几乎不变化 (图 3b). 从图 3a 可以得出直线的斜率为 $-0.0242 \mu\text{A/min}$, 该数据可用于判断氧化苯乙烯对 DNA 化学损伤的速率.

3 结论

用伏安法研究了 PN 与 DNA 的相互作用, 其作用方式是嵌入作用. PN 可用于 DNA 损伤电化学检测的探针分子. 本文电化学检测 DNA 损伤的优点在于能有效降低其它电活性物质对检测的干扰.

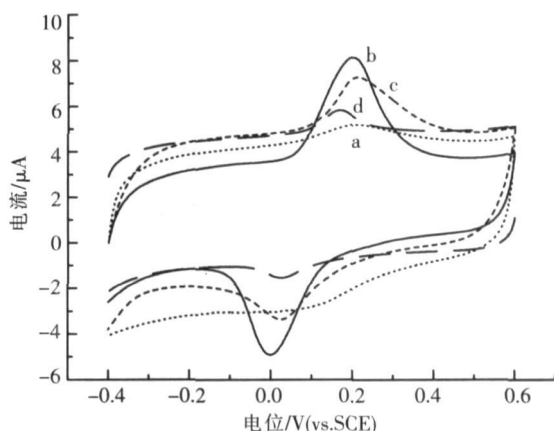


图 2 CNT/GC (a)、PN-CNT/GC (b)、PN-DNA-PDDA-CNT/GC (c) 和经氧化苯乙烯损伤 10 min 的 PN-DNA-PDDA-CNT/GC 电极 (d) 在醋酸缓冲溶液中的循环伏安曲线. 扫速为 50 mV/s

Fig.2 Cyclic voltammograms in acetate buffer (pH 5.5) for CNT/GC (a), PN-CNT/GC (b), PN-DNA-PDDA-CNT/GC (c) and PN-DNA-PDDA-CNT/GC electrode after chemical damaged by styrene oxide for 10 min (d). The scan rate: 50 mV/s

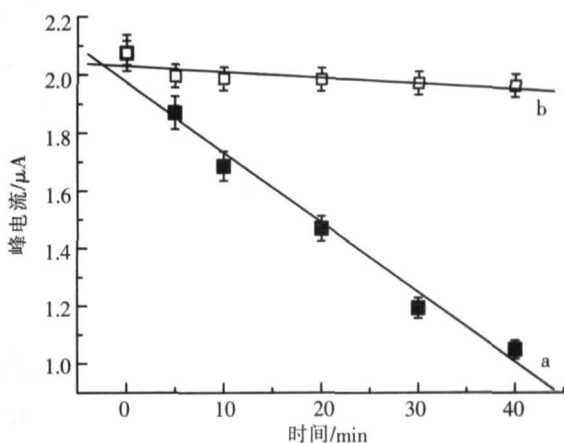


图 3 PN 峰电流与氧化苯乙烯 (a) 和甲苯 (b) 与 DNA 作用时间的关系

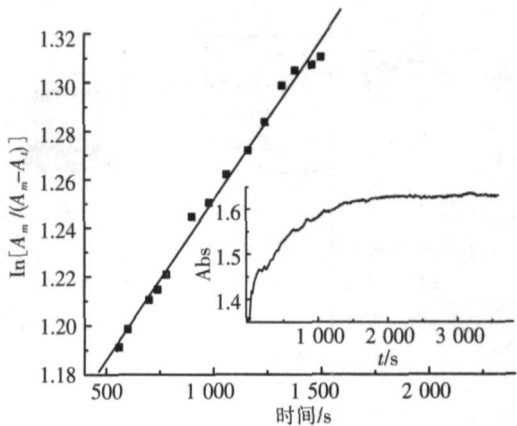
Fig.3 Dependence of voltammetric response of PN on the damage time of styrene oxide (a) and toluene (b) on the DNA

【参考文献】

- [1] Deforce D L D, Lemièrre F, Esmans E L, et al. Analysis of the DNA damage induced by phenylglycidyl ether using capillary zone electrophoresis-electrospray mass spectrometry [J]. Anal Biochem, 1998, 258(2): 331-338
- [2] Yang J, Zhang Z, Rusling J F. Detection of chemically induced damage in layered DNA films with $\text{Co}(\text{bpy})_3^{3+}$ by square-wave voltammetry [J]. Electroanalysis, 2002, 14(21): 1494-1499.
- [3] Sistiare M F, Cadden S J, Heinrich G, et al. Effects of base stacking on guanine electron transfer rate constants for G and GG sequences of oligonucleotides from catalytic electrochemistry [J]. J Am Chem Soc, 2000, 122(19): 4742-4749.
- [4] Palecek E, Fojta M. DNA hybridization and damage [J]. Anal Chem, 2001, 73(3): 74A-83A. (下转第 124 页)

3 结论

实验表明, 我们建立的这套高压紫外在线分光光度计可适用于超临界流体中反应动力学研究. 该装置操作简单、拆卸方便, 可以灵活设定温度和压力且可以在线检测, 相比其它间接方法优势明显. 该装置还可以用于超临界流体内化合物溶解度的测定和超临界微乳液中水池微结构的研究, 为超临界萃取提供试验数据. 相关研究正在进行中.



$T=308.65\text{ K}, p=14.80\text{ MPa}, [I^-]=9.76\times10^{-4}\text{ M}, [S_2O_8^{2-}]=4.88\times10^{-5}\text{ M},$
 $k=5.62\times10^{-5}\text{ s}^{-1}, R=0.996\ 35$

图 5 $\ln[A_m/(A_m-A_t)]$ 与时间 t 的关系
Fig.5 Plot of $\ln[A_m/(A_m-A_t)]$ vs. t

[参考文献]

[1] Mendes R L, Reis A D, et al Supercritical CO₂ extraction of γ-Linolenic acid (GLA) from the cyanobacterium Arthrospira (Spirulina) maxima experiments and modeling[J]. Chemical Engineering Journal 2005, 105(3): 147-151.

[2] Dean J R, Liu B Supercritical fluid extraction of chinese herbal medicines investigation of extraction kinetics[J]. Phytochem Anal 2000, 11(1): 1-6

[3] Chialvo A A, Cummings P T, Kalyuzhnyi Yu V. Solvation effect on kinetic rate constant of reactions in supercritical solvents [J]. J. A ChE Journal 1998, 44(3): 667-680

[4] Cott D J, Ziegler K J, Owens V P, et al Diels-Alder reactions between maleic anhydride and furan derivatives in supercritical CO₂ [J]. Green Chem, 2005, 7(2): 105-110

[5] Hiroyuki Ohde, Marko Ohde, Franklin Bailey, et al Water- in- CO₂ microemulsions as nano-reactors for synthesizing CdS and ZnS nanoparticles in supercritical CO₂ [J]. Nano Lett 2002, 2(7): 721-724

[6] 刘士军, 陈启元, 舟桥重信. 超临界二氧化碳中卟啉与钴(II)、镍(II)、锌(II)配合物反应动力学[J]. 物理化学学报, 2005, 21(8): 893-897

[7] 闻利群, 张树海, 张景林. 黑索今炸药在超临界二氧化碳中溶解特性的实验研究[J]. 含能材料, 2006, 14(3): 178-180

[8] Fernandez Cid M V, Van Der Kraan M, Veugeliers W J T, et al Kinetics study of a dichlorotriazine reactive dye in supercritical carbon dioxide[J]. J of Supercritical Fluids 2004, 32(1/3): 147-152

[9] Hutton B H, Perera J M, Griesser E, et al Investigation of AOT reverse microemulsions in supercritical carbon dioxide[J]. Colloids and Surfaces A, 1999, 146(1/3): 227-241.

[10] 安学勤, 王涛, 沈伟国. 微乳液体系中过硫酸钾氧化碘离子的动力学研究[J]. 化学学报, 2002, 60(6): 980-984

[责任编辑: 顾晓天]

(上接第 121 页)

[5] Pang D W, Abruna H D Micro method for the investigation of the interactions between DNA and redox-active molecules [J]. Anal Chem, 1998, 70(15): 3 162- 3 169.

[6] Latham G J, Lloyd R S Deoxynucleotide polymerization by HIV-1 reverse transcriptase is terminated by site-specific styrene oxide adducts after translesion synthesis [J]. J Biol Chem, 1994, 269(46): 28 527- 28 530

[7] Chen J, Bao J C, Cai C X, et al Electro-catalytic oxidation of DNA at an ordered carbon nanotubes modified glassy carbon electrode[J]. Anal Chim Acta 2004, 516(1): 29- 34

[8] Liu S N, Cai C X. Immobilization and characterization of alcohol dehydrogenase on single-walled carbon nanotubes and its application in sensing ethanol [J]. J Electroanal Chem, 2007, 602(1): 103- 114

[9] Carter 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]. J Am Chem Soc 1989, 111(24): 8 901- 8 911.

[责任编辑: 顾晓天]