

DNA 修饰碳纳米管电极对 DNA 与亚甲基蓝相互作用的研究

张 怀¹, 张云怀¹, 李 静¹, 肖 鹏², 乔 雷¹, 李泽全¹

(1. 重庆大学 化学化工学院, 重庆 400030; 2. 重庆大学 数理学院, 重庆 400030)

摘要: 通过羧基化的多壁碳纳米管 (MWNTs) 电极表面的 $-\text{COOH}$ 与 DNA 末端的 $-\text{NH}_2$, 在 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 和 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 活化作用下, 制备了 DNA 共价修饰 MWNTs 电极。采用循环伏安法系统研究了固定在 MWNTs 电极表面的 DNA 与亚甲基蓝 (MB) 之间的相互作用。实验结果表明: 在 $20 \sim 200 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$ 范围内, MB 在 DNA 修饰 MWNTs 电极上的氧化还原过程为表面控制过程; 在 pH 5.1 ~ 7.6 范围内, MB 在 DNA 修饰 MWNTs 电极上的峰电位随 pH 的增加向负方向移动。

关键词: 多壁碳纳米管; 脱氧核糖核酸 (DNA); 修饰; 亚甲基蓝; 电化学

中图分类号: O657.15; Q523 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 - 4957(2008)10 - 1035 - 04

DNA Modified Multi-walled Carbon Nanotubes Electrode for the Study of Interaction between DNA and Methylene Blue

ZHANG Hua¹, ZHANG Yun-hua¹, LI Jing¹, XIAO Peng², QIAO Lei¹, LI Ze-quan¹

(1. College of Chemistry & Chemical Engineering, Chongqing University, Chongqing 400030, China;

2. College of Mathematics & Physics, Chongqing University, Chongqing 400030, China)

Abstract: A deoxyribonucleic acid (DNA) modified multi-walled carbon nanotubes (MWNTs) electrode was prepared by covalently binding carboxyl groups of the nanotubes and amino groups at the ends of DNA oligonucleotides through the activation of N-hydroxy-succinimide (NHS) and 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC). The interactions of DNA immobilized on MWNTs electrode with methylene blue (MB) were investigated by cyclic voltammetry (CV). The experimental results showed that the anodic and cathodic peak potentials were both shifted to negative direction with increasing pH from 5.1 to 7.6. The redox currents of MB at DNA modified MWNTs electrode had linear relationship under scan rate from 20 to 200 $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$, which indicated that the redox reaction was a surface controlled process.

Key words: multi-walled carbon nanotubes; DNA; modify; methylene blue; electrochemical

碳纳米管 (CNTs) 自 1991 年被 Iijima^[1] 发现以来, 因其独特的结构、电学、机械等性能, 引起物理、化学及材料等研究领域的极大关注。碳纳米管具有优良的导电性、大的比表面积和良好的生物亲和性, 是一种理想的电极材料。因此, 将碳纳米管应用到修饰电极将为生物传感器的发展带来更大的进步。近年来国内外主要利用酶^[2]、蛋白质^[3-4]、抗原/抗体^[5]、DNA^[6-7] 等对碳纳米管修饰电极进行研究。碳纳米管用作电极材料时, 可将纳米材料本身的物理化学特性引入传感器, 同时也能具有碳纳米管比表面积大、表面活性高、催化效率高、表面带有较多的功能基团以及良好的生物亲和性等优异性质, 因而能固定较大量的生物活性分子, 提高其固定效率、修饰电极的响应信号、灵敏度等性能。

近年来, 小分子化合物与 DNA 相互作用的研究是生命科学研究的热门话题, 特别是一些药物和毒物分子与 DNA 的作用^[8-9]。DNA 修饰电极的表面电化学方法具有简便、可靠、DNA 用量少等优点, 并且还可获得许多相互作用的热力学及动力学参数。亚甲基蓝 (MB) 是电化学中常用的用于 DNA 杂交研究的探针分子, 陈洪渊^[10] 利用 MB 与 环糊精形成包合物, 以铂盘电极为工作电极研究了溶液中 MB 与 DNA 之间的相互作用; 鞠先等^[11] 利用巯基乙酸在金电极表面自组装, 共价固定 DNA, 利用

收稿日期: 2008 - 03 - 31; 修回日期: 2008 - 04 - 23

基金项目: 重庆市自然科学基金资助项目 (CSTC2005BB4200); 重庆大学研究生科技创新基金资助项目 (200701Y1A0140200)

第一作者: 张 怀 (1981 -), 男, 河南驻马店人, 硕士研究生, Tel: 13658376586, E-mail: zzh304@163.com

MB 作为杂交指示剂, 研究认为 MB 的还原态比其氧化态更易与固定在电极上的 DNA 形成氢键; 庞代文^[12]先将巯基化的 dDNA 修饰到金电极, 再将该修饰电极在 MB 溶液中冲洗后, 在相应的不含 MB 的高离子强度的空白溶液中扫描, 研究 DNA 与 MB 的相互作用。

本文利用羧基化的 MWNTs 电极与 DNA 末端的 $-NH_2$, 在缩合剂 N 羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 和 1 乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 活化作用下, 制备 DNA 修饰 MWNTs 电极, 利用该电极研究 DNA 与 MB 之间的相互作用, 并考察了扫描速率、pH 对 MB 在 DNA 修饰碳纳米管电极电化学反应的影响。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

MWNTs (美国), 5'-NH₂-GACAACTCCAACGAGACATGCTAC-3' dDNA (上海生物工程技术有限公司), N 羟基琥珀酰亚胺 (NHS)、1 乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳二亚胺盐酸盐 (EDC) (上海延长生化科技发展有限公司), 亚甲基蓝 (MB) (上海第三化工厂); 所用试剂均为分析纯, 所有溶液均用二次石英蒸馏水配制。

CHI 660C 电化学工作站 (上海辰华仪器公司), 三电极系统: 化学修饰电极为工作电极, 银-氯化银 (Ag/AgCl) 为参比电极, 铂丝为对电极; KQ-50B 超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司), DZF-150 型真空干燥箱 (郑州长城科工贸有限公司), pH S-3C 型酸度计 (上海大普仪器有限公司)。

1.2 DNA 修饰碳纳米管电极的制备

称取 50 mg MWNTs 与 60 mL 浓酸 [$V(HNO_3) : V(H_2SO_4) = 3 : 1$] 混合, 于室温下超声 4 h, 洗涤并干燥后得到羧基化的 MWNTs。

玻碳 (GC) 电极为基体电极, 在抛光布上分别用 3.0 μm 和 0.3 μm 的 Al_2O_3 打磨, 打磨好的电极取出洗净后分别在硝酸溶液 (体积比 1 : 1)、丙酮、二次水中各超声 5 min。把处理好的玻碳电极放入 0.5 mol/L 的 H_2SO_4 中于 -1.2 ~ 2.0 V 活化至电极稳定。取制备好的适量 MWNTs 分散液滴加到处理过的玻碳电极表面, 红外灯烘干即制得 MWNTs 修饰电极。

将制备的 MWNTs 修饰电极在 EDC 与 NHS 溶液中浸泡活化 30 min 后浸入含有 DNA 的缓冲溶液中 2 h, 再用同样的缓冲溶液冲洗掉吸附的未反应 DNA 和其它杂质, 在红外灯下干燥, 即制得 DNA 修饰 MWNTs 电极。

2 结果与讨论

2.1 MB 在不同电极上的电化学反应

分别对裸玻碳电极 (a)、MWNTs 电极 (b)、DNA 修饰 MWNTs 电极 (c) 在含有 MB 的缓冲溶液中的循环伏安行为进行了研究。由图 1 可知, 在裸玻碳电极 (a) 上, MB 有 1 对很好的氧化还原峰, 说明 MB 在裸玻碳电极上是一个准可逆电极过程。在 MWNTs 修饰电极 (b) 上 MB 的氧化还原峰电流与裸玻碳电极相比明显升高, 这是由于碳纳米管的多孔性, 使得 MWNTs 电极具有较大的表面积和表面活性, 能明显提高 MB 在 MWNTs 电极上的吸附量, 且 MWNTs 具有能提高电极表面电子的转移速率等特性, 使得 MB 的氧化还原峰电流明显提高。而在 DNA 修饰 MWNTs 电极 (c) 上发现, MB 的氧化还原峰电流又有提高, 这是由于 DNA 修饰碳纳米管后, 碳纳米管电极表面的 DNA 带有的大量负电荷磷酸骨架对 MB 阳离子具有静电吸引作用, 强烈的静电作用使溶液中更多的

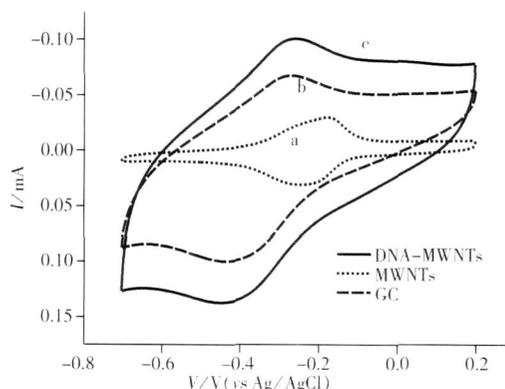


图 1 MB 在裸 GC 电极 (a), MWNTs 电极 (b) 和 DNA 修饰 MWNTs 电极 (c) 的循环伏安图

Fig. 1 Cyclic voltammograms of MB on bare GC electrode (a), MWNTs electrode (b) and DNA modified MWNTs electrode (c)
scan rate: 50 mV/s

MB 分子被吸附到电极表面发生反应, 同时, DNA 修饰在 MWNTs 电极上后, DNA 上的自由碱基 G 更多的暴露在外, 自由碱基 G 与 MB 具有很强的亲和力从而使更多的 MB 富集在电极表面^[13-14], 因而 DNA 修饰 MWNTs 电极氧化还原电流比 MWNTs 修饰电极的氧化还原电流又有提高。这些电化学信号也表明 DNA 分子确已被修饰到 MWNTs 电极表面, 多次扫描后, 循环伏安图基本不发生变化, 说明电极具有良好的稳定性。

2.2 扫描速率对 MB 在 DNA 修饰 MWNTs 电极上峰电流的影响

20 ~ 350 $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$ 范围内, MB 在 DNA 修饰 MWNTs 电极上的氧化还原峰电流随扫描速率变化的循环伏安曲线如图 2 所示, 随着扫描速率的增加, 阴极峰、阳极峰电流逐渐增加。

实验结果表明, MB 的氧化还原峰电流与扫描速率平方根的关系曲线呈弯曲状, 而与扫描速率呈良好的线性关系 (如图 2 插图所示), 线性回归方程分别为 $I_{pc} = 1.15288 + 15.54899 v (r=0.9947)$ 和 $I_{pa} = -0.76114 - 18.37814 v (r=0.9964)$ 。该实验结果说明 MB 在 DNA 修饰 MWNTs 电极上的氧化还原过程为表面控制。文献 [15] 也得到了同样的结论。

2.3 pH 对 MB 在 DNA 修饰碳纳米管电极上氧化还原峰的影响

当扫描速率不变, PBS 的 pH 值在 5.1 ~ 7.6 范围内变化时, MB 在 DNA 修饰电极上随 pH 变化的循环伏安曲线如图 3 所示。在此 pH 范围内, 阳极峰电位 (V_{pa}) 和阴极峰电位 (V_{pc}) 皆随 pH 的增加向负电位方向线性移动, 线性回归方程分别为 $V_{pa} (\text{mV}) = -0.01136 - 0.0344 \text{ pH} (r=0.9875)$ 和 $V_{pc} (\text{mV}) = -0.07478 - 0.03703 \text{ pH} (r=0.9902)$ 。说明该反应在电子转移之前先发生了质子的还原反应, 同时从图中可以发现随着 pH 的增加, 阴极峰与阳极峰也有下降的趋势, 这是由于氢离子在电化学反应中不仅作为反应物还作为膜中电子的抗衡离子, 随着溶液中反应物离子浓度的降低, 即溶液中氢离子浓度的降低, 而必将引起反应中离子电导下降, 峰的强度与电量也会随之降低。因此 MB 在 DNA 修饰 MWNTs 电极上的氧化还原过程不仅有电子参与, 还有质子参与。

根据能斯特方程计算 MB 的氧化还原过程的质子转移数发现, MB 在 -0.1 ~ 0.7 V 范围内的氧化还原反应为 2 电子与 1 质子的转移过程^[16], 其具体氧化还原过程如图 4 所示。

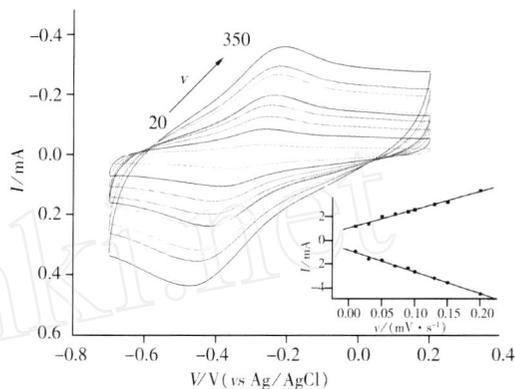


图 2 不同的扫描速率时 MB 在 DNA 修饰 MWNTs 电极上的循环伏安曲线

Fig. 2 Cyclic voltammograms of MB on DNA modified MWNTs electrode with different scan rates scan rate: 20 ~ 350 $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$

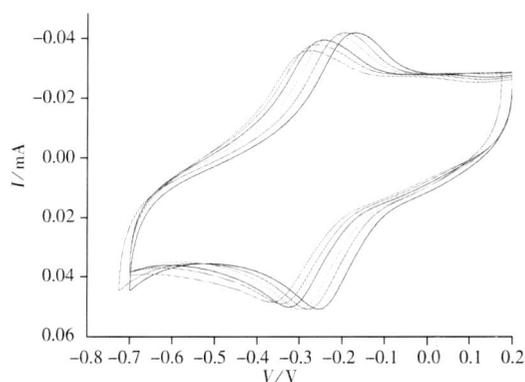


图 3 pH 值改变时 MB 在 DNA 修饰 MWNTs 电极上的循环伏安曲线

Fig. 3 Cyclic voltammograms of MB at DNA modified MWNTs electrode with different pH values pH (from left to right): 7.6, 7.1, 6.6, 6.1, 5.6, 5.1; $c_{\text{MB}} = 5.0 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$

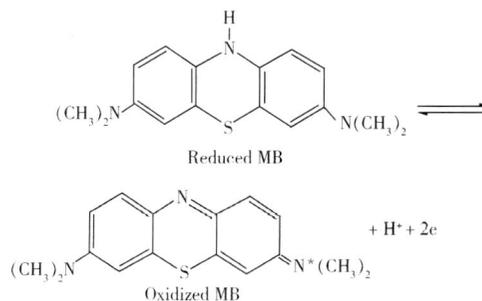


图 4 MB 的氧化还原反应

Fig. 4 Redox reaction of MB

参考文献:

- [1] IJIMA S Helical microtubes of graphitic carbon[J]. Nature, 1991, 358: 56 - 58
- [2] CHEN R J, ZHANG Yuegang, WANG Dunwei, et al Noncovalent sidewall functionalization of single-walled carbon nanotubes for protein immobilization[J]. J Am Chem Soc, 2001, 123: 3838 - 3839.
- [3] 王宗花, 陆捷, 闫永臣, 等. L-色氨酸功能化多壁碳纳米管的制备与表征 [J]. 分析测试学报, 2007, 26(1): 62 - 65.
- [4] 李娜, 袁若, 柴雅琴, 等. 基于蛋白 A/纳米金/壳聚糖分散的多壁碳纳米管修饰的电位型甲胎蛋白免疫传感器的研究 [J]. 分析测试学报, 2007, 26(6): 769 - 773.
- [5] LN Yi, ELKNT, TAYLOR S, et al Preparation, characterization, and evaluation of immuno carbon nanotubes[J]. Microchim Acta, 2006, 152: 249 - 254.
- [6] GUO Manli, CHEN Jinhua, LU Dengyou, et al Electrochemical characteristic of the immobilization of calf thymus DNA molecules on multi-walled carbon nanotubes[J]. Bioelectrochemistry, 2004, 62(1): 29 - 35.
- [7] HU Chenguo, ZHANG Yiyi, BAO Gang, et al DNA functionalized single-walled carbon nanotubes for electrochemical detection[J]. Phys Chem, 2005, 109: 20072 - 20076.
- [8] 王素芬, 彭图治, 李建平. 电化学方法研究 DNA 与不可逆靶向分子的相互作用 [J]. 化学学报, 2002, 60(2): 310 - 316.
- [9] 张朝红, 臧树良, 苏欣, 等. 三苯基锡化合物与 DNA 作用的光谱研究 [J]. 分析测试学报, 2005, 24(3): 63 - 66.
- [10] ZHAO Guangchao, ZHU Junjie, ZHANG Jingjie, et al Voltammetric studies of the interaction of methylene blue with DNA by means of β -cyclodextrin[J]. Anal Chim Acta, 1999, 394: 337 - 344.
- [11] GU Jiayin, LU Xiaojun, JU Huangxian DNA sensor for recognition of native yeast DNA sequence with methylene blue as an electrochemical hybridization indicator[J]. Electroanalysis, 2002, 14: 949 - 954.
- [12] ZHAO Faqiong, HUANG Lijian, ZENG Baizhao Electrochemical investigation on DNA - gemini complex films immobilized on gold electrode[J]. Acta Chim Sinica, 2003, 61: 22.
- [13] KERMAN K, OZSOZ D, KARA P, et al Voltammetric determination of DNA hybridization using methylene blue and self-assembled alkanethiol monolayer on gold electrodes[J]. Anal Chim Acta, 2002, 462: 39 - 47.
- [14] ERDEM A, KERMAN K, MERIC B, et al Methylene blue as a novel electrochemical hybridization indicator[J]. Electroanalysis, 2001, 13(3): 219 - 223.
- [15] HU Chengguo, HU Shengshui Electrochemical characterization of cetyltrimethyl ammonium bromide modified carbon paste electrode and the application in the immobilization of DNA [J]. Electrochim Acta, 2004, 49: 405 - 412.
- [16] KARA P, KERMAN K, OZKAN D, et al Electrochemical genosensor for the detection of interaction between methylene blue and DNA [J]. Electrochem Commun, 2002, 4(9): 705 - 709.

(上接第 1034 页)

参考文献:

- [1] CUNDY C S The hydrothermal synthesis of zeolites: history and development from the earliest days to the present time [J]. Chem Rev, 2003, 103(3): 663 - 702.
- [2] BAERLOCHER C, MEIER W M, OLSON D H Atlas of zeolite framework types[M]. Fifth Revised Edition, Published on behalf of the Structure Commission of the International Zeolite Association, Elsevier, 2001. <http://www.iza-structure.org/databases/>.
- [3] 黄继武, 尹志民, 聂波, 等. 7A52 铝合金原位加热过程中的物相转变与热膨胀系数测量 [J]. 兵器材料科学与工程, 2007, 30(4): 9 - 12.
- [4] 章西焕, 马鸿文, 杨静, 等. Fe₂O₃ 对 13X 沸石分子筛合成条件及性能的影响研究 [J]. 地学前缘, 2005, 12(1): 157 - 164.
- [5] 关振铎, 张中太, 焦金生. 无机材料物理性能 [M]. 北京: 清华大学出版社, 1992: 119.
- [6] 王立本. 关于沸石类矿物命名法的建议 () [J]. 矿物岩石地球化学通报, 2002, 21(3): 158 - 170.
- [7] 王梯, 周伟正, 林德昌, 等. FER 沸石的系列研究 (. 晶体结构) [J]. 化学学报, 2003, 61(10): 1618 - 1622.