

过氧化聚吡咯修饰金电极研究 全氟化合物对脱氧核糖核酸的损伤

鲁理平* 王飞 康天放 程水源 王玉婷
(北京工业大学环境与能源工程学院, 北京 100124)

摘 要 金电极在含有 1.0 mol/L KCl 的 0.1 mol/L 吡咯溶液中, $-0.3 \sim 0.8$ V 循环扫描 10 圈制备了聚吡咯膜, 在 1.2 V 进行过氧化处理, 得到聚吡咯微孔膜, 并将双链小牛胸腺 DNA 沉积在膜的微孔内, 利用差分脉冲技术以亚甲基蓝(MB)为电化学指示剂研究了新型有机污染物全氟辛烷磺酸(PFOS)对 DNA 的损伤。结果表明随着损伤时间的增加, MB 还原峰电流减小, 表明 PFOS 与 DNA 的相互作用阻碍了碱基鸟嘌呤 G 与 MB 的结合; 同时电极的表面电子传递电阻从 650 Ω 增大到 1350 Ω , 表明 PFOS 对 DNA 的损伤降低了 DNA 的电子传递性能。该 DNA 传感器为研究污染物的毒理提供了新思路。

关键词 脱氧核糖核酸; 聚吡咯; 全氟辛烷磺酸; 化学修饰电极

1 引言

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点, 特别是一些药物和毒物分子与 DNA 的作用^[1-3]。制备 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, Gu 等^[4]利用 MB 与 β_2 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。

全氟有机化合物, 尤其是其代表性化合物全氟辛烷磺酸(PFOS)和全氟辛酸(PFOA)以及它们的盐类作为持久性有机环境污染新成员, 其所造成的全球性生态系统污染已成事实^[5-7]。自 2000 年 3M 公司逐步淘汰使用 PFOS 以来^[8], 人们逐渐认识到 PFOS 和 PFOA 这类化合物具有难降解性、生物蓄积性和沿食物链在生物体内富集作用, 其所造成的环境污染已遍及全球生态系统^[9-13], 已经在环境水体、人体血清和母乳中发现了此类物质^[14-16]。近年来, 随着环境科学界对其研究的日益增多, 其生物毒性研究越来越深入^[17-19]。所以, 在分子水平上研究 PFOS 毒理作用将成为环境科学领域的研究重点。

本研究制备了化学修饰电极(Ppyox/Au/DNA/CME), 以亚甲基蓝(MB)为指示剂, 研究新型有机污染物 PFOS 在此电极上的电化学响应, 探讨了 PFOS 对 DNA 的损伤机理。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

CHI660A 电化学分析仪(上海辰华仪器有限公司); 三电极系统: 修饰金电极为工作电极、饱和甘汞电极为参比电极、铂丝为对电极。KQ218 超声波清洗器(昆明市超声仪器有限公司); 原子力显微镜(Pico Scarr MI)。

小牛胸腺 DNA(Sigma 公司); 全氟辛烷磺酸化合物(40% PFOS, Fluka 公司); Tris-HCl(上海华美生物有限公司); 吡咯(国药集团化学试剂有限公司)经两次重蒸纯化; 浓 H_2SO_4 , KCl, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , 次甲基蓝, HCl, NaCl(北京化工厂); 所用试剂均为分析纯。实验用水为二次蒸馏水。

2.2 修饰电极的制备

金电极使用前, 在抛光机上用粒径为 0.5 μm Al_2O_3 粉悬浊液抛光成镜面, 依次在无水乙醇、水中超声清洗 5 min。将金电极浸入预先用高纯氮除氧的 0.5 mol/L H_2SO_4 溶液中, 在 0.5, 1.5 V 的电位

2010-04-16 收稿; 2010-08-11 接受

本文系国家自然科学基金(No. 21005005)、北京市教委(No. KM201010005014)和北京市人才强教深化计划创新团队(No. PHR201007105)资助

* E-mail: lipinglu@bjut.edu.cn

范围内 CV 扫描 20 圈, 直至得到稳定的伏安图。将上述处理过的金电极用水冲洗, 氮气吹干。再将预处理过金电极浸入到 0.1 mol/L 吡咯 1.0 mol/L KCl 聚合液中, 采用 CV 法在金电极上聚合吡咯, 其扫描电位为 -0.3~0.8 V, 扫速为 50 mV/s, 扫描 10 圈, 即得到吡咯/Au/CME。在聚吡咯修饰膜上施加 1.2 V 高电位进行过氧化处理, 即得到过氧化吡咯(Ppyox)/Au/CME。Ppyox/Au/CME 在 0.1 g/L DNA 溶液中施加电位 0.8 V, 电沉积 DNA 30 min, 即得到 Ppyox/Au/DNA/CME。

2.3 实验方法

电化学检测在 CHI 432(上海辰华仪器公司) 电化学工作站上进行。采用三电极体系, 电化学交流阻抗实验 0.1 mol/L KCl, 10 mmol/L $K_3Fe(CN)_6$ - $K_4Fe(CN)_6$ (1:1, V/V) 溶液, 测量频率范围: 1.0~105 Hz, 电位 0.186 V。差分脉冲实验以 MB 为电化学指示剂, 电位范围 0.2~-0.7 V, 脉冲宽度 0.06 s, 脉冲时间 0.2 s。

3 结果与讨论

3.1 DNA-Ppyox 膜的 AFM 的表征

利用原子力显微镜研究了金电极表面 Ppyox/Au 膜和 Ppyox/Au/DNA/CME 膜形貌的差异。由图 1A 可以明显看出, Ppyox/Au 膜的表面较粗糙, 并且紧密分布着一些直径小于 20 nm 的微孔结构^[20], 其膜的厚度小于 10 nm。由于 DNA 的沉积, Ppyox/Au 膜的表面上的这些孔穴被填充, 得到了比较平滑且紧密的 DNA-Ppyox 生物复合膜(图 1B)^[21]。

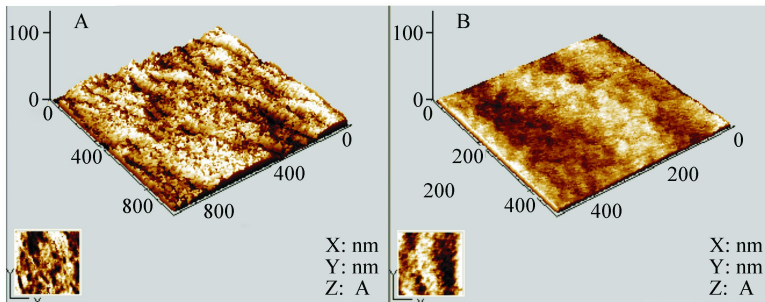


图 1 电极表面原子力显微镜图: (A) 金表面的过氧化聚吡咯膜; (B) 金表面的过氧化聚吡咯膜组装 DNA

Fig.1 AFM of peroxide polypyrrole modified gold film (Ppyox/Au) (A); Ppyox/Au/DNA (B)

3.2 电极界面阻抗研究

图 2 为不同修饰条件下的金电极在含 0.1 mol/L KCl+ 10.0 mmol/L $K_3Fe(CN)_6$ - $K_4Fe(CN)_6$ (1:1, V/V) 溶液中的交流阻抗曲线(EIS)。整个阻抗谱由两部分组成: 高频段是受动力学控制的过程, 而低频段是受扩散控制的行为, 其直径等于电极的表面电子传递电阻。由图 2 可见, 阻抗谱在低频部分近似为一个小半圆, 修饰上聚吡咯膜后, 半圆的直径增大 1 倍, 这表明该膜阻碍探针分子 $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ 在电极上的电子传递。在进一步修饰 DNA 后, 半圆的直径继续增大, 这是因为 DNA 链上的磷酸骨架负电荷阻碍了探针分子的响应。当在 PFOS 中浸泡后, 半圆的直径增大 2 倍多, 其原因可能是 PFOS 导致了 DNA 构象变化, 或 PFOS 和 DNA 发生结合作用进一步阻碍了探针分子的响应。由图 2 可见, 不同修饰状况下的电极低频部分的阻抗值分别为: Ppyox/Au/DNA-PFOS (1350 Ω) > Ppyox/Au/DNA (650 Ω) > Ppyox/Au (450 Ω) > Au (250 Ω)。

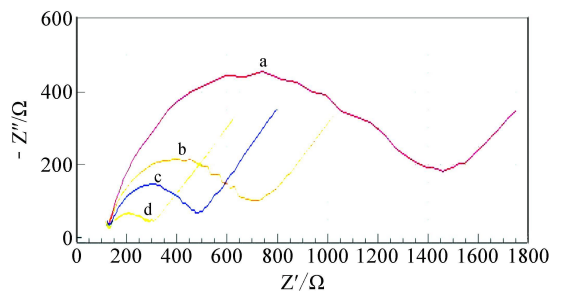


图 2 电化学阻抗图谱

Fig.2 Electrochemical impedance spectra (a) Ppyox/Au/DNA/CME 经 PFOS 浸泡损伤 (Incubated in perfluorooctanoic acid (PFOS)); (b) Ppyox/Au/DNA/CME; (c) Ppyox/Au; (d) bare Au electrode.

3.3 MB 电化学响应

MB 是电化学中常用的用于 DNA 杂交研究的探针分子, 以 Ppyox/Au/DNA/CME 为工作电极, 饱

和甘汞电极为参比电极, 铂丝为对电极, 以 MB 作为指示剂, 利用差分脉冲法研究 DNA 与 MB 的相互作用^[22]。

单链 DNA-Ppyox 和双链 DNA-Ppyox 生物复合膜在 20 mmol/L MB+ 0.1 mol/L PBS 溶液中的差分伏安曲线如图 3 所示。由图 3 可见, MB 在单链 DNA-Ppyox 生物复合膜上的电流响应比双链 DNA-Ppyox 的略大。由此可以推测出, 单链 DNA-Ppyox 生物复合膜由于 DNA 分子链上外露的碱基比双链 DNA-Ppyox 生物复合膜上多, 单链 DNA 上的自由碱基 G 更多地暴露在外, 与 MB 的结合增多^[23], 从而使更多的 MB 富集在电极表面, 因而单链 DNA 修饰金电极还原电流比双链 DNA 修饰金电极的电流高。

考察了 Au/DNA-Ppyox 复合膜在 MB 中富集时间的关系(图 4)。随着时间的延长, MB 的响应还原电流逐渐增加, 在 15 min 时达到最大, 之后缓慢增加, 并趋于稳定。

3.4 Au/dsDNA-Ppyox/CME 在 PFOS 中浸泡不同时间的影响

对 Au/DNA-Ppyox/CME 复合膜在相同浓度 PFOS 中浸泡时间的关系进行了研究(PFOS 溶液浓度为 4%, 浸泡时保持恒温 37 °C), 图 5 为 Au/ds-Ppyox/CME 在 PFOS 中分别浸泡 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 和 60 min 后, 在 20 mmol/L MB+ 0.1 mol/L PBS 中富集 15 min 的差分脉冲曲线图。DNA-Ppyox/Au/CME 在 PFOS 中随着浸泡时间的逐渐延长, 还原峰电流逐渐衰减。0~5 min 时衰减明显, 之后随着浸泡时间的增加衰减的速度减缓, 30 min 后逐渐稳定。由此可以推测出主要原因可能是因为污染物 PFOS 对 DNA 上的自由碱基 G 的损伤。自由碱基 G 与 MB 具有良好亲和力, 而 PFOS 对外露自由碱基 G 的损伤使其与 MB 的亲和力降低, 从而导致峰电流的降低; 也有可能是因为 PFOS 的存在使一定空间中 MB 分子与 DNA 的结合比例降低, 从而导致了 DNA 上自由碱基 G 与 MB 的接触机会, 影响了两者的富集, 使峰高和还原峰电流降低。随着在 PFOS 中浸泡时间的延长, 衰减逐渐减缓直至趋于稳定。

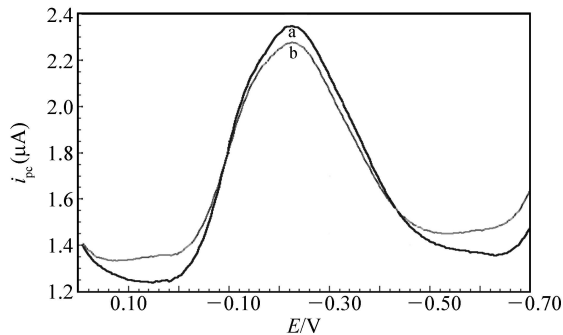


图 3 差分脉冲曲线

Fig. 3 Differential pulse voltammograms

(a) 单链 ssDNA-Ppyox; (b) 双链 dsDNA-Ppyox (20 mmol/L methylene blue (MB) + 0.1 mol/L PBS)。DPV 参数(Parameters): 脉冲放大(Pulse amplitude) 50 mV, 脉冲时间(Pulse period) 0.2 s, 脉冲宽度(Pulse width) 0.06 s。

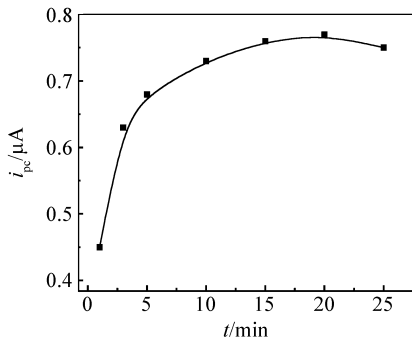


图 4 DNA 与 MB 不同富集时间的还原峰电流图

Fig. 4 Effect of MB accumulation time

Conditions are the same as in Fig. 3.

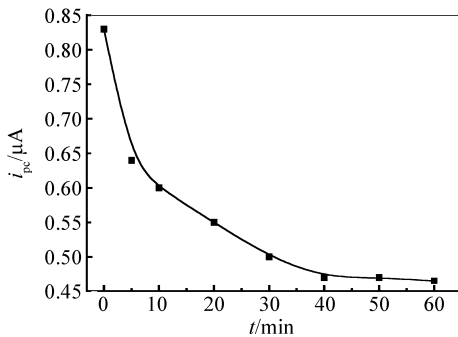


图 5 Ppyox-DNA/Au/CME 在 PFOS 中浸泡时间还原峰电流图

Fig. 5 Effect of incubated time

4% PFOS, 37 °C, Conditions were the same as in Fig. 3.

3.5 DNA-Ppyox/Au/CME 在 PFOS 中不同离子强度的影响

以 PFOS 为溶剂, NaCl 为溶质, 配制出浓度分别为 0.01, 0.1, 1, 10, 100 和 1000 mmol/L 溶液, 在相同条件下分别制备出 7 支 dsDNA-Ppyox/Au/CME, 其中一支用作空白对照(溶液中不含 NaCl 的 PFOS)。将 7 支修饰好的金电极分别在上述 6 种不同离子强度的 PFOS 溶液以及空白液中浸泡 30 min 后, 在含有 20 mmol/L MB+ 0.1 mol/L PBS 中富集 15 min, 在外加电压扫描范围 0.2~ - 0.7 V 下进

行差分脉冲扫描, 结果如图6所示, 随着离子强度的逐渐增强, 还原峰电流值逐渐衰减, 由此可以推测出离子强度对DNA损伤有影响, 使得DNA上外露的自由碱基G与MB的富集情况变差, 导致还原峰电流降低; Na^+ 的存在可能影响了DNA与PFOS以及MB的结合形式, 从而使还原峰电流降低。

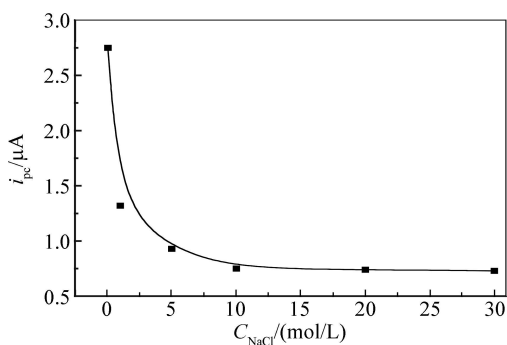


图6 Ppyox-DNA / Au / CME 在 PFOS 体系中离子强度与亚甲基蓝峰电流关系曲线

Fig.6 Effect of ionic strength

20 nmol/L MB, Ppyox-DNA / Au / CME incubated PFOS) 其它条件同图3 (Conditions were the same as in Fig. 3)。

References

- 1 WANG Su Feng, PENG Tu Zhi, LI Jiar Ping(王素芬, 彭图治, 李建平). *Acta Chimica Sinica* (化学学报), **2002**, 60(2): 310~ 316
- 2 GUAN Xiao Hong, DENG Hui Min, LIN Zhong Xiang(管小虹, 邓慧敏, 林中祥). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2010**, 38(8): 1172~ 1176
- 3 ZHANG Chao Hong, ZANG Shu Liang, SHU Xin(张朝红, 臧树良, 苏欣). *Journal of Instrumental Analysis* (分析测试学报), **2005**, 24(3): 63 ~ 66
- 4 GU J Y, LU X J, JU H X, CHEN H Y. *Electroanalysis*, **2002**, 14(13): 949~ 954
- 5 Grasty R C, Bjork J A, Wallace K B. *Birth Defects Research, Part B Develomental and Reproductive*, **2005**, 74(5): 405~ 416
- 6 Giesy J P, Kannan K. *Environ. Sci. Technol.*, **2001**, 35(7), 339~ 1342
- 7 Giesy J P, Kannan K. *Environ. Sci. Technol.*, **2002**, 36(7), 46A~ 152A
- 8 Wood A, Clarin W, *Chemical Week*, **2000**, 162(21): 9
- 9 Guruge K S, Taniyasu S, Yamashita N, Wijeratna S, Mohotti K M, Seneviratne H R, Kannan K, Yamanaka N, Miyazaki S. *J. Environ. Monit.*, **2005**, 7(4): 371~ 377
- 10 Guruge K S, Taniyasu S, Yamashita N, Wijeratna S, Mohotti K M, Mueller J F, Van Bavel B. *Environ. Sci. Technol.*, **2006**, 40(12): 3742~ 3748
- 11 Hekster F M, Laane R W P M, de Voogt P. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, **2003**, 179(6): 99~ 121
- 12 Hu W Y, Jones P D, Decoen W, King L, Frakwe P, Newsted J L, Giesy J P. *Comp. Biochem. Physiol.*, **2003**, 135(1): 77~ 88
- 13 Hu W Y, Jones P D, Celius T, Giesy J P. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **2005**, 19(1): 57~ 70
- 14 Houde M, Czub G, Small J M. *Environmental Science & Technology*, **2008**, 42(24): 9397~ 9403
- 15 Ehresman D J, Froehlich J W, Olsen G W, *Environmental Research*, **2007**, 103(2): 176~ 184
- 16 Volkel W, Genzel-Boroviczeny O, Demmelmair H. *International J. Hygiene and Environmental Health*, **2008**, 211(3-4): D440~ 446F
- 17 Shi X J, Du Y B, Lam P K S, *Toxicology and Applied Pharmacology*, **2008**, 230(1): 23~ 32
- 18 Johansson N, Eriksson P, Viberg H. *Toxicological Sciences*, **2009**, 108(2): 412~ 418
- 19 Steenland K, Tinker S, Shankar A. *Environmental Health Perspectives*, **2010**, 118(2): 229~ 233
- 20 Allan W, Anna B. *Anal. Chem.*, **1992**, 64(6): 635~ 641
- 21 JIANG Xiao Hua, LIU Wei Qiang, CHEN Jiar Jun(蒋晓华, 刘伟强, 陈建军), *Chem. J. Chinese Universities* (高等学校化学学报), **2007**(3), 28: 450~ 452
- 22 Wei Zh, Tao Y, Chen J, Kui J. *Applied Surface Science*, **2008**, 254(15): 4750~ 4756
- 23 Boon E M, Barton J K, Bhagat V, Nersissian M, Wang W, Hill M G. *Langmuir*, **2003**, 19(22): 9255~ 9259

Electrochemical Deoxyribonucleic Acid Damage Treated with Perfluorinated Compounds on Peroxide Polypyrrole Modified Gold Electrode

LU Li Ping^{*}, WANG Fei, KANG Tian Fang, CHENG Shui Yuan, WANG Yu Ting

(College of Environmental and Energy Engineering, Beijing University of Technology, Beijing 100124)

Abstract The polymerization of pyrrole was fabricated on gold electrode by cyclic scan in the solution of 0.1 mol/L pyrrole containing 0.1 mol/L KCl between -0.3 and 0.8 V at a scan rate of 50 mV/s for 10 cycles. Then, the PPy membrane was electrochemically oxidized at $+1.2$ V. The film is porous. Following, the double-stranded calf thymus DNA was deposited within the pores. DNA damage induced by organic pollutant PFOS was studied by the differential pulse voltammetry (DPV) and take methylene blue (MB) as electrochemical indicator. The results show MB reduction peak current decreases with the incubation time increasing and the ionic strength enhanced. It indicates that the interaction of PFOS and the DNA hinders the combination of guanine (G) and MB. The electronic transfer resistance has increased from 650 Ω to 1350 Ω . It indicated DNA damage due to PFOS reduces the electron transfer properties. The DNA biosensor provides a novel avenue to research the pollutant toxicology.

Keywords Deoxyribonucleic acid; Polypyrrole; Perfluorinated compounds; Chemically modified electrode

(Received 16 April 2010; accepted 11 August 2010)

中国化学会第三届全国“公共安全领域中的化学问题”学术研讨会 (第一轮通知)

由中国化学会主办,首都师范大学、北京微量化学研究所、中国人民解放军防化研究院、中国人民公安大学共同承办的第三届全国“公共安全领域中的化学问题”学术研讨会,拟于 2011 年 8 月中旬在山东省蓬莱市召开。会议主题是“科学发展与化学安全”,旨在进一步加强国防、公共安全、安全保卫、公众安全与健康等领域的合作与学术交流,为构建和谐社会、维护国家的长治久安作出贡献。热诚欢迎广大学者、相关单位代表及相关仪器厂商参会,具体事宜请与会务组联系。

一、征文范围

(1) 警务装备、侦查、禁毒、消防、重大活动安全保卫等;(2) 炸药与毒品等危险品的侦检及处置、恐怖预警与危害评估、人身防护材料等;(3) 化学防护、反化学恐怖、化学事故及救援、化武履约等;(4) 食品安全、环境安全、劳动保护、科研与生产安全等;(5) 相关领域的仪器装备研发。(6) 其他:包括公共安全领域中的分析检测方法研究、非共识化学问题等。

二、论文要求

(1) 论文格式按照《化学通报》要求,请标明与会作者(+)和通讯作者(*)。(2) 征文截止日期为 2011 年 5 月 15 日。(3) 录用的论文将以会议论文集形式出版,优秀论文将推荐到中国化学会主办的期刊发表,论文必须通过单位的保密审查,并提交论文保密审查函。(4) 请将论文电子文档发至会议联系人邮箱,同时将打印稿 1 份及论文保密审查函邮寄给会议联系人。

三、会议联系人

刘明 地址:北京市西三环北路 105 号,首都师范大学生命科学学院,邮编:100048

电话:010-68903381 转 608,传真:010-68904756 邮箱:dianalm@163.com

吴珍珠 地址:北京市 2709 信箱,中国化学会,邮编:100190

电话:010-62625583,传真:010-62568157 邮箱:wzz@iccas.ac.cn