

## 电化学石英晶体微天平实时表征和定量检测短序列 DNA

张盛龙 彭图治\*

(浙江大学化学系 杭州 西溪校区 310028)

**摘要** 利用电化学石英晶体微天平(EQCM)这一灵敏的质量和电化学传感器测定特定序列 DNA. 应用自组装膜技术在压电石英晶振表面自组装一带羧基的  $\alpha$ -硫辛酸单层膜, 通过盐酸 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)及 *N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS)共价固化寡聚核苷酸为探针, 用于测定与其碱基序列互补的 DNA. 实验中 EQCM 实时监测了  $\alpha$ -硫辛酸的自组装过程、探针固化过程及其与 cDNA 杂交过程. 定量得出了探针固化量及 cDNA 杂交量. 在酸性、中性和碱性条件下, 分别对固化和杂交过程进行表征, 实验发现探针固化及 DNA 杂交都受 pH 影响, 本文对此现象进行了解释. 同时, 利用染料 Hoechst 33258 的电化学活性, 使其与双链 DNA 嵌合, 通过测定 Hoechst 33258 的电化学信息进一步验证了 DNA 杂交关键步骤.

**关键词** 电化学石英晶体微天平, 特定序列 DNA, 自组装膜, 杂交

## Real-time Characterization and Determination of Short DNA Sequences with Electrochemical Quartz Crystal Microbalance

ZHANG Sheng-Long PENG Tu-Zhi\*

(Department of Chemistry, Xixi Campus, Zhejiang University, Hangzhou, 310028)

**Abstract** Electrochemical quartz crystal microbalance (EQCM), which is capable of sensitive measurement for mass and electrochemical signals, was employed to analyze specific-sequence DNA. Self-assembled monolayers with carboxy groups were first coated on the gold electrode of a quartz crystal resonator by adsorption of  $\alpha$ -thiostic acid, ssDNA of 20-mer oligonucleotides was then covalently attached to the surface via *N*-ethyl-*N'*-(3-(dimethyl)aminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC), *N*-hydroxysuccinimide (NHS) as probe molecules. The processes for self-assembly of  $\alpha$ -thiostic acid, immobilization of the probe and hybridization of the target DNA were real-time characterized, and the amounts of immobilized ssDNA and hybridized cDNA in acidic, basic and neutral solutions were determined. It is found that both of the amounts of immobilized ssDNA and hybridized cDNA are depended on solution pH, and this phenomenon is explained reasonably in this paper. After hybridization, the gold electrode of the quartz crystal resonator was reacted with Hoechst 33258, which is a DNA minor groove binder and can bind to dsDNA hybrids. Electrochemical signals of Hoechst 33258 were measured to characterize the processes of DNA hybridization. Qualitative and quantitative analysis of specific sequence of DNA can be performed in this way without a label.

**Keywords** electrochemical quartz crystal microbalance, specific-sequence DNA, self-assembly membrane, hybridization

\* Email: tzp@emb.zju.edu.cn

收稿日期: 2001-01-11, 修回日期: 2001-05-28, 定稿日期: 2001-06-18, 国家自然科学基金(29975024)和浙江省自然科学基金(200061)资助项目

(Received January 11, 2001. Revised May 28, 2001. Accepted June 18, 2001)

现代生物学已证明 DNA 是生物遗传的主要物质基础,生物机体的遗传信息以密码的形式编排在 DNA 分子上,表现为特定的核苷酸排列顺序<sup>[1]</sup>.不同的生物常具有相同的或相似的特定序列 DNA 片断,享有一定的同源性<sup>[2]</sup>.因此,特定序列 DNA 的检测和分析具有非常重要的意义.不论是原核生物还是真核生物的基因中都存在一些特定序列,它们对基因的表达、调控、转录和翻译有重要作用.检测特定序列 DNA 不仅对分子生物学和分子遗传学理论研究很有帮助,而且在医学研究和疾病诊断中有良好应用前景<sup>[3-6]</sup>.

DNA 序列检测的传统方法使用到放射性同位素标记,且操作繁琐费时.各种新技术的显著改进在于采用了非放射性同位素标记物,如生物素、地谷新配基及荧光染料<sup>[6]</sup>.基于荧光信号的测定是目前 DNA 测定最常用的方法,但所需仪器昂贵,难于实现自动化.此外,聚合酶链反应(PCR)也已广泛用于感染病毒的测定.PCR 可将待测部分的碱基扩增,该方法虽具有很高的灵敏度,但需要复杂的样品预处理过程,分析时间较长,且难于定量测定目标 DNA.

电化学石英晶体微天平(EQCM)是一种非常灵敏的质量检测器,可同时测得质量变化和电化学信号.石英晶振电极上的物质质量变化,会引起石英晶体谐振频率变化.晶体谐振频率的降低正比于电极上质量的增加,Sauerbrey 方程描述了两者的关系,这是石英晶体微天平(QCM)定量测定的基础<sup>[7-9]</sup>.目前,关于 QCM 用于生化分析已有报道<sup>[3,4]</sup>,但 EQCM 表征和检测 DNA 未见报道.本文应用  $\alpha$ -硫辛酸在石英晶振表面自组装一带羧基的单层膜,应用偶联试剂盐酸 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)和 *N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS)共价固定有 20 个碱基的寡聚核苷酸(其 5' 端修饰了一  $\text{NH}_2$ )作为探针,用于检测与其碱基序列互补的特异 cDNA 片断.此方法无须利用标记物,不仅可以实时定性检测特定序列 DNA,还可对其进行定量分析(检测原理见图 1).实验中利用 QCM 实时监测了  $\alpha$ -硫辛酸的自组装过程、探针的固化及其与 cDNA 杂交过程,定量得出了探针固化量及与其杂交 cDNA 的量.Hoechst 33258 是 DNA 的一种小沟结合染料<sup>[6]</sup>,能与富含 AT 系列区作用,而且具有电化学活性,实验中作为双链 DNA 指示剂,所得电化学信号与质量信号相互印证,实时、准确地表征了 DNA 杂交步骤.

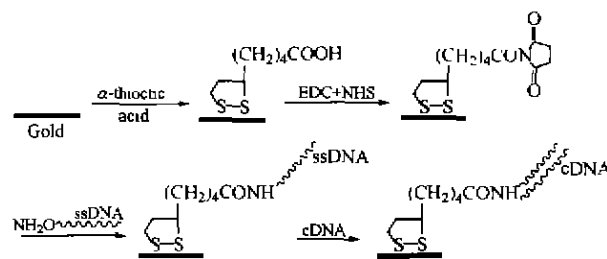


图 1 检测原理示意图

Fig. 1 The scheme for determination of cDNA on ssDNA - modified EQCM electrodes

## 1 实验部分

### 1.1 试剂

探针 DNA (ssDNA, 5' - XATGGGTATTCAA-CATTTCGG, X =  $-\text{NH}_2$ )、其互补 DNA (cDNA) (5' - CGGAAATGTTGAATACC) 和不互补 (ncDNA) (5' - GACGTCAGCA) 由浙江大学生物研究所提供。 $\alpha$ -硫辛酸, Hoechst 33258, EDC 和 NHS 为 Sigma 产品. 甲酰胺, 甘氨酸为上海试剂一厂产品. 所有试剂为分析纯, 溶液用重蒸水配制.

### 1.2 仪器

AT - 切型石英晶振(双面镀金), 7.995 MHz, 晶片直径 13.7 mm, 电极直径 5.1 mm. Model 440 型时间分辨型 EQCM, Teflon 反应小池(晶振电极装在其内), 铂电极, Ag/AgCl 参比电极均为 CHI 公司产品. 晶片一面和小池溶液接触, 另一面与 O 型橡胶圈接触, 在 Teflon 反应小池底部形成一空气室.

### 1.3 自组装 $\alpha$ -硫辛酸单层膜

石英晶振使用前先浸入到无水甲醇溶液 30 min, 然后超声清洗 1 min, 再用重蒸水洗涤, 空气中晾干. 将洗涤干净的石英晶振迅速置于 Teflon 反应小池, 加入 0.5 mL 0.3 mol/L  $\alpha$ -硫辛酸的乙醇溶液, 启动 EQCM, 对此自组装过程进行实时监测 2 h, 记录频率变化.

### 1.4 探针的固化

从 Teflon 反应小池中取出晶振电极, 用重蒸水洗涤, 空气中晾干. 滴加 10  $\mu\text{L}$  100 mg/mL EDC 和 10  $\mu\text{L}$  100 mg/mL NHS 至自组单层膜修饰的石英晶振表面, 固化 20 min. 重蒸水洗涤, 于空气中晾干. 在晶振金电极表面上加入 10  $\mu\text{L}$  5' 端带有一  $\text{NH}_2$  的 ssDNA 探针溶液 ( $10^{-4}$  mol/L), 反应 30 min. 用 1/15 mol/L 磷酸缓冲溶液 (PBS, pH 7.0) 洗涤, 于空气中

晾干备用。

### 1.5 杂交

经过上述处理后的晶振电极装入到 Teflon 反应小池,用 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲溶液 (pH 7.0, 含 50% 甲酰胺),作为杂交缓冲溶液,加到 Teflon 反应小池中。待晶振频率稳定后,加入 10  $\mu$ L ncDNA,启动 EQCM,记录频率变化作为空白对照,然后加入 cDNA,记录频率变化,用以计算杂交的 cDNA 量。杂交完成后,用重蒸水洗涤电极,晾干。

### 1.6 Hoechst 33258 嵌合和电化学测定

用 1/15 mol/L 磷酸缓冲溶液 (pH 7.0) 配制  $1.0 \times 10^{-4}$  mol/L Hoechst 33258 溶液,将此溶液加到装有和 cDNA 杂交后晶振电极的 Teflon 反应小池里,室温嵌合 15 min。倒出溶液,用重蒸水洗涤电极,空气中晾干。加入磷酸缓冲溶液 (pH 7.0) 到装有经修饰后石英晶振的 Teflon 反应小池,用示差脉冲伏安法 (DPV) 进行电化学测定。测试完成后,晶振电极浸入到甲醇溶液中 30 min,超声清洗 1 min,再用重蒸水洗涤 3 次,每次 1 min,晶振即可重复使用。

## 2 结果与讨论

### 2.1 晶振电极的表面更新

文献介绍用 Piranha (浓  $H_2SO_4$  和 30%  $H_2O_2$  混合液,体积比为 3/1) 对石英晶振进行预处理<sup>[4]</sup>。但 Piranha 有很强的氧化性,须小心操作,且严重损坏晶振电极的金属导线。为了找到更好的清洗方法,我们分别用乙醇,甲醇, *N,N*-二甲基甲酰胺以及按不同配比组成的混合液进行清洗,并与 Piranha 洗涤效果比较,发现甲醇能将吸附在晶振电极上的  $\alpha$ -硫辛酸洗清,对装置无损坏,且能得到重现性结果。

### 2.2 $\alpha$ -硫辛酸自组装效果

硫原子与金、银和铂等金属基体有很强的相互作用,文献已报道许多含硫化合物 (如硫化物、二硫化物以及巯基化合物等) 与金属自组装形成致密有序的单层膜<sup>[10]</sup>,这种自组装单层膜有很好的机械和化学稳定性。 $\alpha$ -硫辛酸通过 S-S 键部位与金作用可修饰在金电极表面, QCM 对此过程的实时监测见图 2。从图中可以看出,频率在初始时下降很快,1.5 h 后下降缓慢,表明此时  $\alpha$ -硫辛酸在金电极上的自组装已趋近完成,吸附达到饱和。

为了考察自组装单层膜稳定性,向其上加入磷酸缓冲溶液或甘氨酸-盐酸缓冲溶液,启动 EQCM, 5 min 左右达到稳定,漂移小于 1 Hz/min。表明  $\alpha$ -硫

辛酸自组装单分子层膜在上述缓冲溶液中十分稳定。实验中对自组装过程监控 1.5 h,频率增大约 5 Hz,误差为 +2.8%。

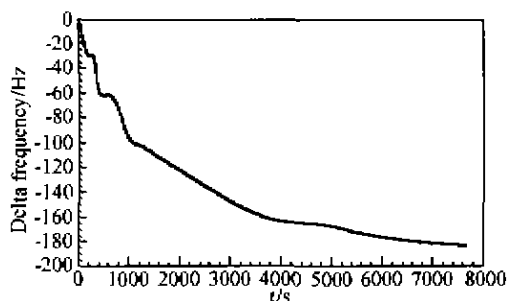


图 2  $\alpha$ -硫辛酸自组装过程频率随时间变化

Fig.2 Frequency response on time for  $\alpha$ -thioctic acid self-assembly from 0.3 mol/L ethanol solution onto an EQCM gold electrode

### 2.3 探针固化及其固化量

通过 1.4 节方法把 ssDNA 直接加在晶振电极表面可以对探针进行固化,但此法无法对固化过程进行定量表征,为了定量测定固化量和研究其影响因素,采用下述方法代替 1.4 进行探针固化。

在装有  $\alpha$ -硫辛酸修饰晶振电极的 Teflon 反应小池中,加入 0.3 mL 0.2 mol/L EDC 和 0.05 mol/L NHS,活化电极 30 min,重蒸水洗涤,于空气中晾干。重复上述步骤直到晶振频率稳定。向 Teflon 反应小池中加入 0.3 mL 0.1 mol/L 甘氨酸-盐酸缓冲溶液 (pH 2.3), 10 min 后加入 10  $\mu$ L 5'端带有一  $NH_2$  的 ssDNA,启动 EQCM,对 ssDNA 固化过程进行实时监测,记录频率变化。通过晶振频率变化可观察探针的固化过程 (图 3),并计算出固化量,表 1 显示了在甘氨酸-盐酸缓冲溶液 (pH 2.3) 中不同浓度探针溶液的固化量。实时检测的结果表明,ssDNA 逐步固化在电极表面,1.5 h 后趋于饱和。

### 2.4 pH 值对探针固化量的影响

5'端带有一  $NH_2$  的 ssDNA 分别加到甘氨酸-盐酸缓冲溶液 (pH 2.3)、磷酸缓冲溶液 (pH 7.0) 和磷酸缓冲溶液 (pH 10.0) 的三种体系中进行测定,从图 4 中可以看出,酸性条件下固化量最大,而中性条件下固化量最小,探针的固化量和 pH 值关系很大。我们认为,在酸性条件下固化量增大这一现象可能和静电作用有关。腺嘌呤 6-C 位、鸟嘌呤 2-C 位和胞嘧啶 4-C 位  $-NH_2$  的  $pK_a$  值分别为 3.7, 2.4 和 4.5<sup>[11]</sup>,当 pH 值为 2.3 时都已被质子化了,而金电极表面的  $\xi$  电位为负值<sup>[12]</sup>。因此,5'端修饰了一  $NH_2$  的 ssDNA 在酸性条件下会通过此静电作用趋向电

极表面, 当我们在探针固化时用不互补的 ncDNA 代替 5' 端修饰了一  $\text{NH}_2$  的 ssDNA 加到 Teflon 反应小池中, 发现频率也有下降, 说明这种静电作用的确存在。

表 1 在不同浓度 ssDNA 溶液中探针固化量

Table 1 Immobilized amount of a modified quartz crystal electrode in glycine-HCl buffer (pH 2.3) with different ssDNA concentrations

| 浓度/<br>( $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) | ssDNA 探针固化量<br>$f/\text{Hz}$ | $m/\text{ng}$     |
|--|------------------------------|-------------------|
| 3.3  | $-343 \pm 11$                | $462.5 \pm 14.8$  |
| 5.0  | $-540 \pm 14$                | $728.1 \pm 18.9$  |
| 6.0  | $-633 \pm 16$                | $853.6 \pm 21.6$  |
| 8.0  | $-740 \pm 18$                | $997.8 \pm 24.3$  |
| 10.0   | $-842 \pm 20$                | $1135.4 \pm 26.9$ |

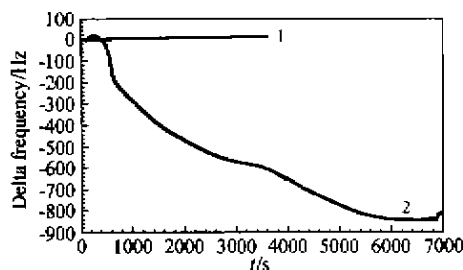


图 3 ssDNA 在甘氨酸-盐酸缓冲溶液中固化到修饰过 EQCM 电极过程频率随时间变化图

曲线 1 表示加入空白缓冲溶液对照过程, 曲线 2 表示固化过程

Fig. 3 Frequency response on time in a blank solution (curve 1) and for immobilization of ssDNA onto a modified EQCM electrode from glycine-HCl buffer (curve 2)

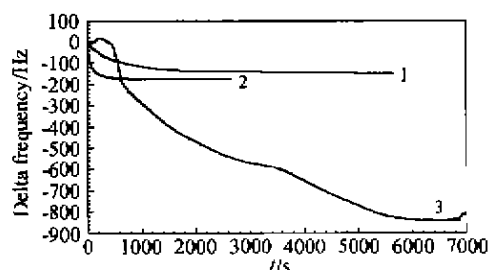


图 4 pH 对 ssDNA 固化量的影响

1—磷酸缓冲溶液 (pH 7.0); 2—磷酸缓冲溶液 (pH 10.0);  
3—甘氨酸缓冲溶液 (pH 2.3)

Fig. 4 Effect of solution pH on immobilized amount

1—Phosphate buffer (pH 7.0); 2—phosphate buffer (pH 10.0);  
3—glycine-HCl buffer (pH 2.3)

中性或碱性条件下, 腺苷不能被质子化, 也就不存在静电吸附, 探针的固化主要通过化学键键合, 但在碱性条件下探针固化量大于中性条件下的, 我们认为引起这一现象的可能原因为, 胺交换反应为亲

核取代反应, 碱对胺交换反应起了催化作用。从图 4 中可以看到, 碱性条件下不仅固化量大于中性条件, 而且固化过程很快完成, 由此推断此过程受碱催化而使探针 ssDNA 分子易于键合到  $\alpha$ -硫辛酸修饰电极上。

## 2.5 最佳杂交 pH 的选取

为了得到杂交的最佳 pH 条件, 分别在甘氨酸-盐酸缓冲溶液 (pH 2.3)、磷酸缓冲溶液 (pH 7.0) 和磷酸缓冲溶液 (pH 10.0) 的三种体系中进行杂交分析。从表 2 可知, cDNA 杂交量中性条件下最大。这一结果的原因可能为, 尽管酸性条件下探针固化量最大, 但由于核苷酸质子化碱基在静电作用下吸附到金电极表面, 从而阻碍杂交的进行。而在 pH 10.0 溶液中, 碱性试剂会破坏碱基之间氢键和相邻碱基之间的堆集力<sup>[13]</sup>, 从而阻碍 DNA 双螺旋结构的形成。因此, 实验选用磷酸缓冲溶液 (pH 7.0) 作杂交缓冲溶液。

表 2 pH 对 ssDNA 固化量和 cDNA 杂交量的影响

Table 2 Effect of solution pH on amounts of ssDNA and hybridized cDNA

| pH   | 缓冲溶液        | ssDNA 固化量<br>$m/\text{ng}$ | cDNA 杂交量<br>$m/\text{ng}$ |
|------|-------------|----------------------------|---------------------------|
| 2.3  | Glycine-HCl | $1092.2 \pm 45.9$          | $4.6 \pm 0.4$             |
| 7.0  | Phosphate   | $188.8 \pm 10.6$           | $22.4 \pm 1.1$            |
| 10.0 | Phosphate   | $254.9 \pm 16.2$           | $11.7 \pm 1.5$            |

## 2.6 甲酰胺对杂交的影响

溶液成分对杂交过程有一定影响, 实验选用聚乙二醇和甲酰胺以促进杂交反应, 发现在含甲酰胺的缓冲溶液中 DNA 杂交时间大大缩短, 而且频率变化大, 说明 cDNA 杂交量增大。可能甲酰胺是一种杂交促进剂, 能增强 DNA 链中 C/G 碱基对的相互作用, 加速杂交体的形成。进一步实验表明, 甲酰胺体积分数为 50% 时促进作用最好, 浓度若太高, 会引起非特异性结合; 浓度若太低, 促进作用不明显。本文选用含 50% 甲酰胺的磷酸缓冲溶液 (pH 7.0) 作杂交缓冲溶液。

## 2.7 杂交及 cDNA 杂交量

为了考察非特异性吸附及仪器基线漂移等因素影响, 在杂交缓冲溶液中预先加入等量与探针不互补的 DNA, 实时监测 1 h 内其频率变化作为空白对照。从图 5 中显示, 中性条件下不互补 DNA 与探针没有明显作用, 仪器基线漂移小于  $1 \text{ Hz}/\text{min}$ , 且为正向漂移。

当在杂交缓冲溶液中加入 cDNA 后, 晶振频率迅速下降, 15 min 左右即趋于稳定, 表明杂交已趋于

饱和. 比较图 5 中曲线 1、曲线 2 可知, 频率下降是由 cDNA 和探针 DNA 杂交结合而引起的. cDNA 杂交量可根据移频值利用 Sauerbrey 方程得出. 从图 6 可见, 随着 cDNA 浓度增大, 质量信号明显增大, 且在  $10^{-7} \sim 10^{-9} \text{ mol/L}$  范围内具有良好的线性. 线性方程:  $m_{\text{cDNA}}/\text{ng} = 10.08 c/(10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}) - 0.2688$ ; 相关系数  $R = 0.9991$ , 检测下限为:  $2.2 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ .

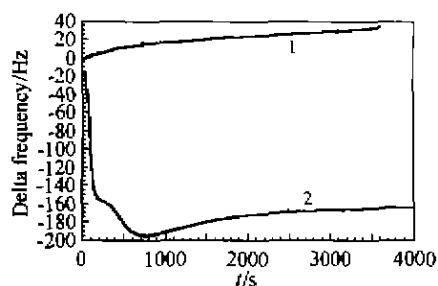


图 5 杂交过程频率随时间变化图

曲线 1 表示加入 ncDNA 过程, 曲线 2 表示加入 cDNA 过程

Fig. 5 Frequency response on time for the ssDNA probe in phosphate buffer (pH 7.0)

1—addition of  $10 \mu\text{L}$  ncDNA; 2—addition of  $10 \mu\text{L}$  cDNA

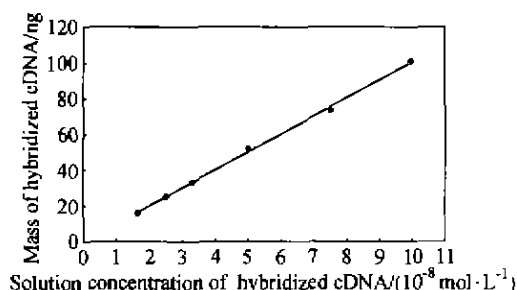


图 6 cDNA 溶液浓度和杂交质量的标准曲线

Fig. 6 The effect of concentration on the mass of hybridized cDNA

## 2.8 Hoechst 33258 嵌合和电化学信号

将与 cDNA 杂交后的晶振电极与  $1.0 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Hoechst 33258 溶液作用. Hoechst 33258 能选择性地与 dsDNA 作用, 因此该试剂可认为是形成 dsDNA 的指示剂. 图 7 中曲线 a 和其它曲线相比可以看到 ssDNA 探针与 Hoechst 33258 作用电信号弱, 而 dsDNA 与 Hoechst 33258 作用后电信号明显增强. 峰电流值 ( $i_p$ ) 随着 cDNA 浓度变化有线性关系.  $i_p$  值变化说明 cDNA 的确与 ssDNA 结合形成了杂交体, 与上述 QCM 结论完全一致. 两者结果互相映证,

说明本文方法能够准确、可靠地检测特定序列 DNA.

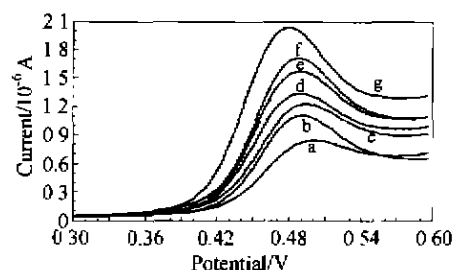


图 7 不同浓度 cDNA 溶液嵌合后 EQCM 电极上 Hoechst 33258 的示差脉冲伏安图

Fig. 7 Differential pulse voltammograms of Hoechst 33258 on the EQCM electrode hybridized with different cDNA concentrations ( $10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )

a—0; b—1.67; c—2.00; d—3.33; e—5.00; f—6.00; g—8.00

致谢 浙江大学分析测试中心为本实验研究提供了有关设备和测试数据, 特此致谢.

## References

- Shen, T.; Wang, J. - Y. *Biochemistry*, 2nd Edn., Higher Education Press, Beijing, 1991, p.320 (in Chinese).
- Yan, L. - F.; Zhang, Y. - L. *Molecular Biology*, 2nd Edn., Chinese Agricultural University Press, Beijing, 1997, p. 475 (in Chinese).
- Ito, K.; Hashimoto, K.; Ishimori, Y. *Anal. Chim. Acta*, 1996, 327, 29.
- Caruso, F.; Rodda, E.; Furlong, D. N.; Niihara, K.; Okahata, Y. *Anal. Chem.*, 1997, 69, 2043.
- Xu, C.; He, P. - G.; Fang, Y. - Z. *Chem. J. Chin. Univ.*, 2000, 21(8), 1197 (in Chinese).
- Hashimoto, K.; Ito, K.; Ishimori, Y. *Anal. Chim. Acta*, 1994, 286, 219.
- Wu, B. - L.; Li, H. - W.; Cha, C. - S. *J. Electroanal. Chem.*, 1994, 374, 97.
- Buttry, D.; Ward, M. D. *Chem. Rev.*, 1992, 92, 1355.
- Zhu, G. - Y.; Wang, Y. *Chin. J. Anal. Chem.*, 1995, 23(9), 1095 (in Chinese).
- Ulman, A. *Chem. Rev.*, 1996, 96, 1533.
- Zhang, L. - X.; Zhang, T. - F.; Li, L. - Y. In *Methods and Techniques of Biochemistry Experiments*, 2nd Edn., Higher Education Press, Beijing, 1997, p.261 (in Chinese).
- Weiser, H. B.; Merrifield, P. J. *Phys. Chem.*, 1950, 54, 990.
- Sun, N. - E.; Sun, D. - X.; Zhu, D. - X. *Molecular Genetics*, Nanjing University Press, Nanjing, 2000, p.10 (in Chinese).

(Ed. PAN Bing - Feng)

(ZHENG Guo - Cheng)