

硫化铅纳米颗粒标记 DNA 电化学探针的研究

祝宁宁

(上海师范大学 生命与环境科学学院, 上海 200234)

摘要: 在水溶液中合成了表面具有自由羧基的硫化铅(PbS)纳米颗粒,以乙基-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDAC)为偶联活化剂,将其标记于人工合成的5'端氨基修饰的寡聚核苷酸(ODN)片段上,制备成PbS纳米颗粒标记DNA探针。在一定的条件下,使其与固定在玻碳电极表面的待测DNA序列进行杂交反应,利用阳极溶出伏安法间接测定Pb(II)的量,从而实现互补、非互补DNA片段的识别和电化学检测。同时对该探针的稳定性、选择性进行了讨论。

关键词: 硫化铅纳米颗粒;电化学DNA探针;DNA杂交

中图分类号: O657 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-5137(2004)02-0065-05

0 引言

脱氧核糖核酸(DNA)是绝大多数生物体的遗传物质。DNA检测不仅对生物学研究至关重要,而且对临床医学、环境检测、法学鉴定等领域具有极其重要的意义^[1]。DNA生物传感器是进行核酸的结构分析和检测的重要手段。它利用DNA分子间的特异性互补配对规律,实现对特定序列DNA的快速识别和检测,已成为当今生物传感器领域中的前沿性课题。通常DNA生物传感器采用的标记方法有同位素、酶、荧光分子、化学发光试剂、生物素和电化学活性物质^[2]等方法。由于电化学方法具有仪器简单价廉、测定快速准确、方法灵敏度高等特点,所以在核酸的分析测定中日益受到人们的重视。电化学DNA生物传感器一般采用电化学活性物质作为杂交指示剂来转换杂交信号,通过此类信号的变化来检测样品中DNA的结构和含量。我们的研究小组^[3-6]曾报道了多种电化学活性物质标记DNA探针用于DNA分子的识别和检测。

本文以乙基-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDAC)为偶联活化剂,将表面具有自由羧基的PbS纳米颗粒标记于人工合成的5'端氨基修饰的寡聚核苷酸(ODN)片段上,制备成PbS纳米颗粒标记DNA探针。在一定条件下,使其与固定在玻碳电极表面的靶DNA序列进行杂交反应,然后利用阳极溶出伏安法(ASV)间接测定杂交后双链DNA(dsDNA/PbS)释放出的Pb²⁺,从而实现对特定序列DNA片段的识别和检测。该方法快速、简便、灵敏度高,对互补序列DNA的检测限为 1.0×10^{-11} mol/L。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

CHI 630 Electrochemical Analyzer (CHI Instruments Inc, USA). Varian Cary 50 ultraviolet-visible

收稿日期: 2003-06-25

作者简介: 祝宁宁(1973-),女,上海师范大学生命与环境科学学院讲师。

spectrophotometer (Varian, USA); Transmission electron microscope (TEM) (Hitachi, Japan); QC 50 型超声波清洗皿(上海必能信超声波有限公司); TDL-16B 型离心机(上海安亭科学仪器厂); JB-1 型搅拌器 Branson; 工作电极: 玻碳电极; 对电极: 铂电极; 参比电极: 银-氯化银电极(饱和 KCl, 3.0 mol/L). 其中面积较大的玻碳电极(7.07 mm²)用于靶 DNA 的固定和与 DNA 探针杂交, 面积较小(3.14 mm²)的镀汞膜电极用于铅的阳极溶出测定.

人工合成的寡聚核苷酸片段(上海申工生物工程公司):

探针序列: 5'-NH₂-GAG CGG CGC AAC ATT TCA GGT CGA -3'

互补序列: 5'-TCG ACC TGA AAT GTT GCG CCG CTC -3'

非互补序列: 5'-GAG CGG CGC AAC ATT TCA GGT CGA -3' (与探针序列相同, 5端无氨基修饰)

PBS 缓冲溶液: 0.3 mol/L NaCl-10 mmol/L 磷酸(pH=7.0); 巯基乙酸(RSH); 1.0 mmol/L 的 Pb(NO₃)₂; 1.34 mmol/L 的 Na₂S; 0.1 mol/L 的乙基-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDAC, Sigma); 咪唑(江苏太仓光耀试剂厂); 含 0.1 mol/L SDS 的磷酸缓冲溶液(pH=7.0); 壳聚糖(1.0% 壳聚糖溶于 1.0% 醋酸中, Aldrich); HAc-NaAc 缓冲溶液(pH=5.3); TE 缓冲溶液(10 mmol/L Tris-HCl + 1.0 mmol/L EDTA, pH=8.0). 其他所有试剂均为分析纯, 所有溶液均用 Aquapro 系统制得三次蒸馏水配制.

1.2 实验方法

1.2.1 PbS 纳米颗粒标记 DNA 探针的制备

参照文献[7]合成了表面具有自由羧基的 PbS 纳米颗粒. 将 9.22 mL 巯基乙酸(RSH)加入 50 mL 浓度为 0.4 mmol/L 的 Pb(NO₃)₂ 溶液中, 用 0.5 mol/L 的 NaOH 调节溶液的 pH 值约为 7, 通氮气除氧 30 min. 不断搅拌的条件下滴入 1.34 mmol/L 的 Na₂S 溶液, 使 Na₂S 与 Pb(NO₃)₂ 的摩尔比为 2.5. 然后在无氧条件下搅拌反应 24 h, 溶液逐渐由无色变为棕色. 该方法制备的 PbS 纳米溶胶冷藏条件下可稳定数月. 通过透射电镜(TEM)测定, PbS 纳米颗粒的平均粒径为 3 nm.

用盐酸调节该 PbS 纳米溶胶 pH 值约为 3.5. 将 200 μL 0.1 mol/L 的咪唑溶液(pH=6.8)加入 2 OD (~66 μg) 5端氨基修饰的寡聚核苷酸(ODN)中活化 30 min, 然后加入 100 μL 0.1 mol/L EDAC 和 5 mL PbS 纳米溶胶, 室温下搅拌反应 12 h. 将该反应物在 10,000 r/min 下离心分离 20 min, 用水洗涤沉淀物, 再离心分离(10,000 r/min, 20 min), 即得 PbS 纳米团簇 DNA 探针(ssDNA PbS probe). 然后重新分散于少量水中, 于 -5 °C 下保存.

1.2.2 待测 ssDNA 在玻碳电极表面的固定

靶 ssDNA 在玻碳电极表面的固定参考文献[8]. 将 2.0 μL 1.0% 壳聚糖溶液均匀滴于新鲜处理好的玻碳电极表面, 空气中自然干燥, 用蒸馏水洗涤电极数次后, 将其置于 1.0 mL 含有目标 DNA 的 TE 缓冲溶液中, 室温下搅拌 60 min, 用 PBS 缓冲溶液洗涤电极数次. 因 DNA 分子与玻碳电极表面的壳聚糖以静电作用形成稳定的络合物而被固定在电极表面.

1.2.3 与 DNA 探针杂交

将固定了目标 ssDNA 的玻碳电极放入含有 PbS 纳米颗粒标记 DNA 探针的杂交缓冲溶液(PBS)中, 40 °C 水浴中搅拌反应 40 min. 然后用含 0.1 mol/L SDS 的磷酸缓冲溶液(pH=7.0)洗涤电极 3 次以除去任何未杂交的 DNA 探针.

1.2.4 PbS 纳米颗粒的溶解及电化学测定

将表面已进行杂交反应的电极(dsDNA/PbS)置于 200 μL 1 mol/L 的硝酸溶液中, PbS 立刻氧化溶解, 加入 1.8 mL pH=5.3 的醋酸-醋酸钠缓冲溶液作为支持电解质. 将面积较小的玻碳电极(面积 3.14 mm²)置于含有 100 mg/L HgCl₂ 的 0.1 mol/L HCl 溶液中于 -1.1 V (vs Ag/AgCl) 恒电位预富集 600 s, 得到汞膜修饰电极. 将该电极置于前述待测液中于 -0.8 V (vs Ag/AgCl) 恒电位预还原 300 s, 然后以 50 mV/s 的扫描速度, 从 -0.8 ~ -0.2 V 反向扫描, 在约 -0.46 V (vs Ag/AgCl) 出现铅的阳极溶出信号.

2 结果与讨论

2.1 PbS 纳米团簇标记 5端-NH₂ 修饰寡聚核苷酸的制备

自由的羧基可与各种生物分子如特异性抗体、功能蛋白质等的氨基发生反应^[9]. 该 PbS 纳米颗粒表面具有自由羧基, 可与寡聚核苷酸探针 5 端的氨基发生缩合反应, 这样 PbS 纳米颗粒即可被标记在寡聚核苷酸片段上. 该 DNA 探针在高盐浓度的溶液(0.3 mol/L 的 PBS)中仍呈现良好的稳定性, 而未经修饰的 PbS 纳米溶胶在此介质中会凝聚. PbS 纳米颗粒标记 DNA 探针的紫外可见吸收光谱见图 1, 从该吸收光谱中可以看出, 经寡聚核苷酸修饰的 PbS 纳米团簇探针在 254.0 nm 出现一个新的吸收带(图 1).

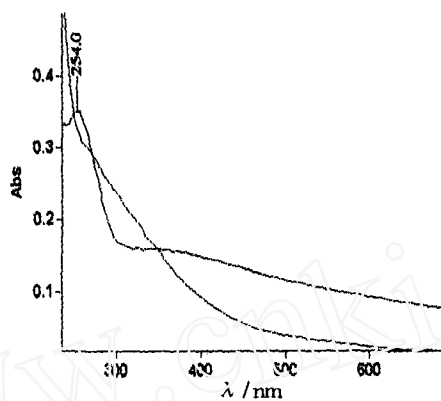


图 1 PbS 溶胶和 PbS-DNA 探针的紫外可见吸收光谱图

表明 DNA 分子被成功地标记在 PbS 纳米颗粒表面, 而且寡聚核苷酸修饰后的 PbS 纳米颗粒的吸收带位移不大, 表明标记后 PbS 纳米颗粒的光学性质和分散性并没发生显著变化.

2.2 DNA 杂交反应的测定

将 PbS 纳米颗粒标记的 DNA 探针与玻碳电极表面互补的靶 DNA 进行杂交反应, 经硝酸氧化处理后, 以汞膜电极为工作电极, 利用阳极溶出伏安法间接测定溶解的 Pb(II). 当外加预还原电位从 $-0.6 \sim -0.8$ V(vs Ag/AgCl) 时, 阳极峰电流不断增加, -0.8 V 以后电流值增加缓慢, 本文选择预富集电位为 -0.8 V(vs Ag/AgCl). 阳极峰电流随着预沉积时间的延长(60 ~ 600 s)而明显增加, 本文选择预沉积时间为 300 s. 分别以不同 pH 值的醋酸-醋酸钠缓冲溶液为测定底液, 实验发现在 pH = 5.3 的醋酸-醋酸钠缓冲溶液中铅的峰形最好, 峰电流值最大, 所以选择该缓冲溶液作为测定 Pb(II) 的底液.

图 2 是相同浓度的完全互补的靶 DNA(图 2a), 非互补的靶 DNA 序列(图 2c)和含三碱基错配的序列(图 2b)分别与 PbS 纳米颗粒标记 DNA 探针杂交后 Pb(II) 的阳极溶出响应. 从该图可知, 与 DNA 探针序列互补的靶 DNA 在 -0.46 V 出现铅的溶出信号, 而非互补的靶序列及三碱基错配的序列与 DNA 探针杂交后, 则没有出现铅的溶出信号, 表明该 PbS 纳米颗粒标记 DNA 电化学探针具有良好的选择性.

分别将一系列不同浓度的与 DNA 探针互补的寡聚核苷酸固定在玻碳电极上, 在含有 PbS/DNA 探针的缓冲溶液(PBS 缓冲溶液)中进行杂交反应(40°C, 40 min). 硫化铅经硝酸溶解后, 用阳极溶出法测定 Pb(II). 随着被固定的寡聚核苷酸浓度的增大, 杂交后 DPV 峰电流逐渐增大, 其线性范围为 $4.0 \times 10^{-11} \sim 2.0 \times 10^{-8}$ mol/L(图 3).

线性方程为: $y = 0.4721 \text{Log}x + 1.6683$ (其中 x 为被测 DNA 的浓度, p · mol/L; y 为 Pb 的阳极峰电流, 10^{-7} A), 线性相关系数 r 为 0.9983. DNA 的检测下限为 1.0×10^{-11} mol/L (3σ , σ 为空白溶液相对标准偏

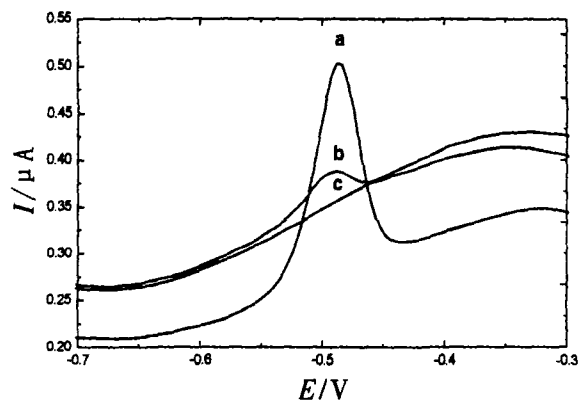


图2 PbS-DNA 探针与互补序列(a), 三碱基错配序列(b)和非互补序列(c)杂交后相应的阳极溶出响应

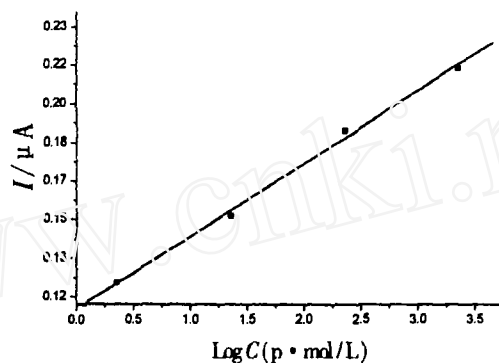


图3 标准曲线图

差. $n = 11$).

3 结论

本文以 PbS 纳米溶胶作为标记物, 利用缩合反应, 将其标记于人工合成的 5' 端氨基修饰的寡聚核苷酸片段上, 制备成具有电化学活性的 PbS 纳米颗粒标记 DNA 探针. 在一定的条件下, 使其与固定在玻碳电极表面的寡聚核苷酸片段进行杂交, 只有含有与 DNA 探针序列完全互补的靶 DNA 出现铅的阳极溶出信号, 检测下限达到 $10 \text{ p} \cdot \text{mol/L}$.

参考文献:

- [1] 庞代文, 顾蔚. 基因传感器目前存在的问题及发展对策[J]. 高等学校化学学报, 2001, 22(3): 389-395.
- [2] WANG J, LIU G D, POLSKY R, et al. Electrochemical stripping detection of DNA hybridization based on cadmium sulfide nanoparticle tags [J]. Electrochem Commun, 2002, 4: 722-726.
- [3] ZHU N N, CAI H, HE P G, et al. $\text{Co}(\text{bpy})_3^{3+}$ doped silica nanoparticle DNA probe for electrochemical detection of DNA hybridization [J]. Anal Chim Acta, 2003, 481: 181-189.

- [4] ZHU N N, ZHANG A P, HE P G, et al. Cadmium sulfide nanocluster-based electrochemical stripping detection of DNA hybridization [J]. *Analyst*, 2003, 128: 260-264.
- [5] CAI H, ZHU N N, HE P G, et al. Cu@Au alloy nanoparticle as oligonucleotides labels for electrochemical stripping detection of DNA hybridization [J]. *Biosen Bioelectron*, 2003, 18: 1311-1319.
- [6] CAI H, XU Y, ZHU N N, et al. An electrochemical DNA hybridization detection assay based on a silver nanoparticle label [J]. *Analyst*, 2002, 127: 803-808.
- [7] MILICA T N, MIRJANA I C, VEANA V, OLGA I M. Transient bleaching of small lead sulfide colloids: influence of surface properties [J]. *J Phys Chem*, 1990, 94: 6390-6394.
- [8] XU C, CAI H, HE P G, et al. Immobilization of ssDNA on chitosan modified electrode [J]. *Fresenius' J Anal Chem*, 2001, 369: 428-432.
- [9] HERMANSON G T. *Bioconjugate Techniques* [M]. New York: Academic Press, 1996. 559-560.

Study on lead sulfide nanoparticle labeled electrochemical DNA probe

ZHU Ning-ning

(College of Life and Environment Sciences, Shanghai Teachers University, Shanghai 200234, China)

Abstract: Synthesis of lead sulfide (PbS) nanoparticles and its application in electrochemical DNA assay were described. The nanoparticles were successfully labeled to a 5'- amino group capped oligonucleotides probe. The DNA assay relies on the target oligonucleotides on the glassy carbon electrode (GCE) hybridization of the PbS nanoparticle-oligonucleotides DNA probe. Hybridization events between probe and target were monitored by the release of the PbS anchored on the hybrids by oxidative dissolution and the indirectly determination of the solubilized Pb^{2+} . The detection limit is 10 pmol/L of the complementary target oligonucleotides.

Key words: PbS nanoparticle; electrochemical DNA probe; DNA hybridization