

# 电化学预处理玻碳电极微分计时电位溶出法 测定 DNA 中的嘌呤碱基及 DNA 浓度

贾文丽, 李天华, 张晶晶, 王怀生  
(聊城大学化学化工学院分析化学研究所, 聊城 252059)

**摘要** 研究了鸟嘌呤(G)、腺嘌呤(A)、鸟嘌呤核苷、腺嘌呤核苷和变性 DNA 在电化学预处理玻碳电极上的恒电流微分计时电位溶出行为. 实验结果表明, 用电化学方法预处理玻碳电极操作简单, 效果明显, 预处理玻碳电极对嘌呤及其核苷和 DNA 的吸附能力大大增强, 用微分计时电位溶出法可以得到灵敏的溶出峰, 溶出峰高( $di/dE$ )与其浓度在一定范围内呈良好的线性关系, 可用于嘌呤碱基及其核苷的定量检测和 DNA 浓度的测定. 将该方法应用于酸变性 DNA 样品中鸟嘌呤与腺嘌呤的同时测定, 选择性好、灵敏度高; 还可获得有关 DNA 损伤的一些信息.

**关键词** DNA; 嘌呤碱基及其核苷; 电化学预处理玻碳电极; 计时电位溶出分析

**中图分类号** O657.1      **文献标识码** A      **文章编号** 0251-0790(2006)11-2056-05

DNA 的氧化性损伤一般发生在嘌呤碱基上, 其中鸟嘌呤因具有最低氧化电位而最容易被氧化<sup>[1]</sup>. 检测体液中嘌呤及核苷的升高水平可以预测 DNA 的损伤程度<sup>[2,3]</sup>, 指示某些疾病的发生<sup>[4-6]</sup>, 而且对于研究 DNA 的代谢过程及其损伤机理有一定的帮助. 早在 40 多年前, Smith 等<sup>[7]</sup>用极谱方法分析检测了嘌呤和嘧啶类化合物, Palecek 等<sup>[8]</sup>用阴极溶出伏安法考察了利用静汞电极检测低含量嘌呤和嘧啶碱基的可能性; Percio 等<sup>[9,10]</sup>则利用鸟嘌呤或腺嘌呤与 Cu 形成的配合物在静汞电极上的特性吸附实现了碱基的痕量检测. 与以上方法相比, 计时电位溶出分析法(CSA)信噪比和灵敏度高、选择性好<sup>[11,12]</sup>, 在 DNA 测定及其杂交检测方面应用较多, 但其工作电极主要是汞电极<sup>[13]</sup>、碳糊电极<sup>[14]</sup>及石墨印刷电极<sup>[15,16]</sup>等. DNA 及其碱基在裸电极上的电化学响应较弱, 而在电化学预处理玻碳电极上的响应信号则大大增强<sup>[17-20]</sup>, 我们<sup>[17-19]</sup>曾将预处理玻碳电极用于 DNA 以及鸟嘌呤和腺嘌呤的同时测定, 获得了满意的结果. 预处理玻碳电极可以提高被测物质的电化学响应, 但背景电流也同时升高, 因此不利于测定浓度较低的样品.

本研究通过电化学预处理方法增大了玻碳电极对嘌呤及其核苷的吸附作用, 进而提高了电化学响应, 利用计时电位溶出法克服预处理玻碳电极背景较高的缺点, 探索了玻碳电极用于 DNA、DNA 中鸟嘌呤和腺嘌呤及其核苷含量测定的最佳条件, 依据溶出峰高与 DNA 及其嘌呤或核苷浓度之间的线性关系定量测定 DNA 或碱基, 并进一步研究了 DNA 损伤的直接电化学检测.

## 1 实验部分

### 1.1 试剂与仪器

鸟嘌呤、腺嘌呤、鸟嘌呤核苷、腺嘌呤核苷及鲑鱼精 DNA 均为生化试剂(ACROSS), 嘌呤及其核苷均用稀碱溶液配制成一定浓度的储备液, 用无菌水配制 1.0 mg/mL 的 DNA 储备液, 于 4 °C 冰箱中保存. 其余试剂均为分析纯, 实验用水为二次蒸馏水, 所有实验均在室温下进行.

伏安测定和计时电位溶出测定分别在 273A 恒电位/恒电流仪(EG&G)和 DS-2004 电化学分析系统(山东济宁东盛电子仪器有限公司)上进行, 采用三电极体系: 电化学预处理玻碳电极为工作电极, 饱

收稿日期: 2005-11-15.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 20475024)资助.

联系人简介: 王怀生(1962 年出生), 男, 博士, 教授, 主要从事电分析化学研究. E-mail: hswang@lctu.edu.cn

和甘汞电极和铂片电极分别为参比电极和对电极.

## 1.2 实验过程

1.2.1 玻碳电极的电化学预处理 按照文献[17]方法, 先将玻碳电极抛光, 充分冲洗后超声清洗约 1 min, 在搅拌和 +1.7 V 电位条件下于 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液(PBS, pH = 5.0)中氧化 300 s 后, 在同一溶液中于 0.3 ~ 1.5 V 循环扫描, 直到循环伏安曲线达到稳定, 即得到电化学氧化预处理玻碳电极.

1.2.2 DNA 的变性处理 将 1.0 mg/mL 的 DNA 储备液装入 10.0 mL 具塞试管中, 用沸水浴加热 10 min, 然后在冰水浴中迅速冷却, 得到热变性单链 DNA(ssDNA)<sup>[21]</sup>. 在 10.0 mL 具塞试管中加入 1.0 mg DNA 和 1.0 mL 1 mol/L 盐酸溶液, 于沸水浴中加热 80 min, 冷却至室温后加 1.0 mL 1 mol/L 氢氧化钠溶液中和, 随后加入 pH = 4.0 的 PBS 稀释至 10.0 mL, 即得到脱嘌呤碱基的酸变性 DNA<sup>[21]</sup>.

1.2.3 实验方法 将三电极体系浸入到含有一定量待测物的 0.1 mol/L PBS 中, 分别选择相应的最佳实验参数, 进行循环伏安或恒电流微分计时电位溶出实验.

## 2 结果与讨论

### 2.1 嘌呤及相应核苷的微分溶出曲线

根据实验结果可以得到各种物质的溶出峰高( $dt/dE$ )与其浓度的关系(表 1). 可见, 用微分计时电位溶出法测定鸟嘌呤和腺嘌呤, 检出限比吸附伏安法<sup>[18]</sup>低接近 1 个数量级, 线性范围较宽. 对于鸟嘌呤核苷也有比较低的检出限和较宽的线性范围. 由于腺嘌呤核苷较难氧化, 必须使用较大的动力电流才能溶出, 因此其检出限相对较高, 与循环伏安法及文献[20]报道的结果一致.

Table 1 Relationships between differential stripping peak height and purines concentration

Sample	No.	Linear range/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	Linear equation	$R$	Detection limit/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$
Guanine	1	0.019 9—1.926 0	$dt/dE = 1.8297 + 29.8370c$	0.999 7	$7.96 \times 10^{-3}$
	2	1.926 0—5.015 0	$dt/dE = 34.9761 + 12.4654c$	0.998 9	
Adenine	1	0.037 0—0.929 0	$dt/dE = 8.8447 + 44.6341c$	0.999 6	$5.32 \times 10^{-3}$
	2	0.929 0—2.908 0	$dt/dE = 33.7000 + 16.9196c$	0.998 0	
	3	2.908 0—5.089 0	$dt/dE = 58.6700 + 8.2112c$	0.997 2	
Guanosine	1	0.023 0—1.901 0	$dt/dE = 2.9578 + 7.4538c$	0.999 2	$1.08 \times 10^{-2}$
	2	1.901 0—4.602 0	$dt/dE = 14.1025 + 1.6442c$	0.998 5	
	3	4.602 0—7.951 0	$dt/dE = 7.4169 + 3.1176c$	0.998 7	
Adenosine		4.490 0—15.720 0	$dt/dE = 1.6502 + 0.2412c$	0.999 1	2.26

图 1 和图 2 分别为鸟嘌呤及其核苷、腺嘌呤及其核苷在预处理电极上的微分计时电位溶出曲线. 可见, 除腺嘌呤核苷外, 其它 3 种物质的溶出曲线几乎没有背景电流.

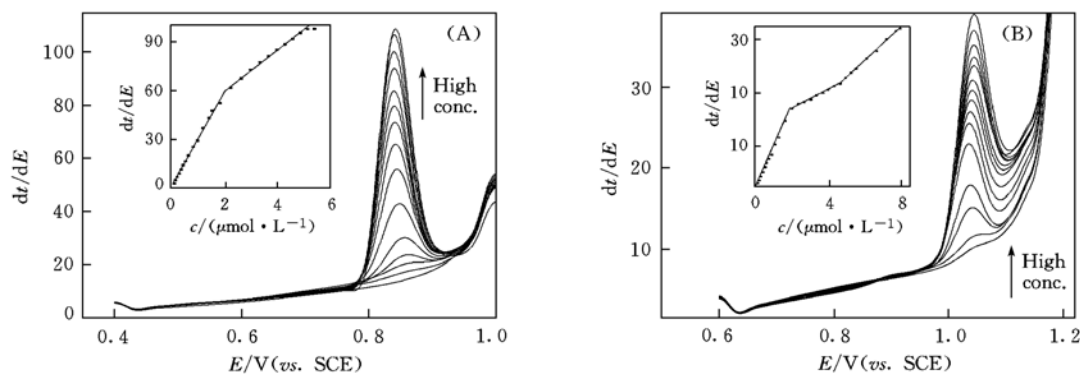
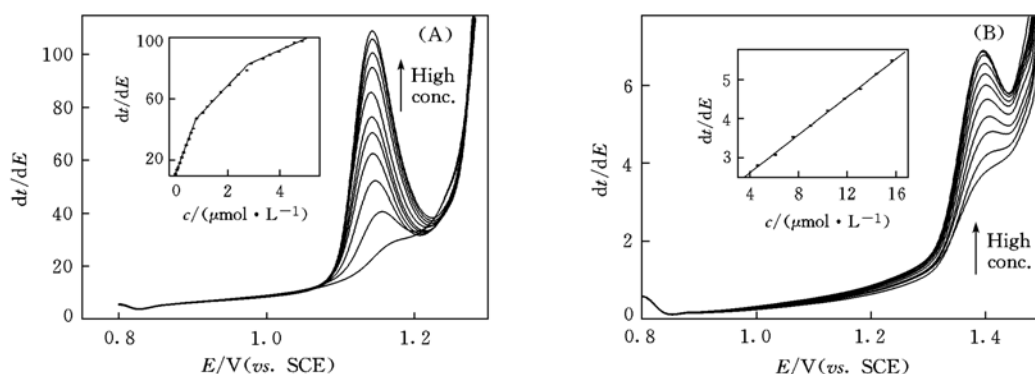


Fig. 1 Differential chronopotentiometric stripping curves of guanine(0.020—1.96  $\mu\text{mol/L}$ ) (A) and guanosine(0.023—1.9  $\mu\text{mol/L}$ ) (B) at the electrochemically pretreated GCE

Accumulation potentials were 0.3 V(guanine) and 0.4 V(guanosine), constant currents were 5  $\mu\text{A}$ (guanine) and 8  $\mu\text{A}$ (guanosine), respectively. The inset plots show the relationships between stripping peak heights( $dt/dE$ ) and concentrations of guanine(A) and guanosine(B), respectively.



**Fig. 2** Differential chronopotentiometric stripping curves of adenine(0.037—0.93  $\mu\text{mol/L}$ )(A) and adenosine(4.49—15.72  $\mu\text{mol/L}$ )(B) at the electrochemically pretreated GCE. Accumulation potential were 0.4 V(adenine) and 0.5 V(adenosine), constant current were 8  $\mu\text{A}$ (adenine) and 110  $\mu\text{A}$ (adenosine). The inset plots show the relationships between stripping peak height( $dt/dE$ ) and concentrations of adenine(A) and adenosine(B), respectively.

## 2.2 底液 pH 的影响

分别以 0.1 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , NaCl, HAc-NaAc,  $\text{NH}_3\text{-NH}_4\text{Cl}$  和 PBS 作为支持电解质进行实验, 结果表明, 在 PBS 中 4 种物质的溶出较灵敏, 且溶出峰形较好. 支持电解质的 pH 值对各物质的溶出有较大影响, 在 pH = 2.0 ~ 11.0 的 PBS 溶液中, 随着 pH 值的增加, 溶出峰电位均向负电位方向线性移动, 且斜率( $dE/d\text{pH}$ )相近, 峰电流减小. 这说明嘌呤碱基的氧化溶出过程中有质子参与. 如果各碱基氧化过程中得失电子数相同, 则参与氧化过程的质子数也相同. 结合实际情况, 实验选择 0.1 mol/L 和 pH 值为 4.0 的 PBS 作支持电解质.

## 2.3 实验条件的选择与优化

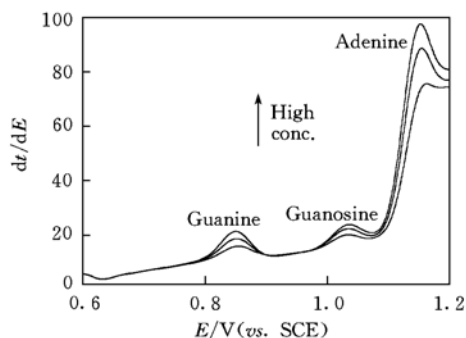
**2.3.1 溶出电位范围的选择** 首先对鸟嘌呤、腺嘌呤、鸟苷和腺苷进行循环伏安扫描, 发现其氧化峰电位分别为 0.85, 1.20, 1.05 和 1.39 V, 而计时电位溶出峰电位分别为 0.84, 1.14, 1.04 和 1.40 V. 根据计时电位溶出实验的要求, 选择合适的溶出电位范围, 鸟嘌呤为 0.4 ~ 1.0 V, 腺嘌呤为 0.8 ~ 1.3 V, 鸟苷为 0.6 ~ 1.2 V, 腺苷为 0.8 ~ 1.55 V.

**2.3.2 溶出电流和补偿系数的选择** 溶出电流的大小决定了富集在电极表面物质的溶出速度, 而溶出速度与检测灵敏度密切相关. 溶出电流大则溶出速度快, 但灵敏度低; 溶出电流太小则溶出速度过慢甚至不能溶出; 另外溶出电流的大小影响溶出曲线的形状. 在保证溶出峰形与峰高的情况下, 应尽量选择较小的溶出电流, 据此选择溶出电流分别为鸟嘌呤 5  $\mu\text{A}$ , 鸟苷 8  $\mu\text{A}$ , 腺嘌呤 8  $\mu\text{A}$ , 腺苷 110  $\mu\text{A}$ .

补偿系数是仪器所设定的对充电电流的补偿程度, 若溶出速度过快, 可以通过适当的补偿来有效降低. 但若补偿过大, 则溶出速度太慢, 甚至不能溶出. 经反复试验, 获得最佳的补偿系数均为 5.

## 2.4 鸟嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤核苷的同时溶出

在选择的最佳实验条件下进行鸟嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤核苷的同时溶出实验, 记录 0.6 ~ 1.2 V 范围内的微分计时电位溶出曲线如图 3 所示, 三者的溶出峰分离得比较好, 各峰之间基本无干扰. 该结果对于了解 DNA 代谢产物的种类及 DNA 的损伤机理有一定帮助, 比如 DNA



**Fig. 3** Simultaneous differential chronopotentiometric stripping curves of guanine (0.16—0.31  $\mu\text{mol/L}$ ), adenine (0.16—0.81  $\mu\text{mol/L}$ ) and guanosine (0.16—0.32  $\mu\text{mol/L}$ ) at the chemically pretreated GCE in 0.1 mol/L pH = 4.0 PBS

损伤后的产物是以游离嘌呤还是以核苷的形式存在, 可以为判断 DNA 的损伤部位提供有用的信息. 因腺苷需要较大的恒电流作为溶出动力, 在该实验条件下未能得到同等浓度下腺苷的溶出峰.

## 2.5 DNA 样品测定

在选定的最佳实验条件下, 对热变性和酸变性 DNA 样品进行了计时电位溶出实验, 溶出曲线如图 4 和图 5 所示. 根据文献[21]结果, DNA 经热变性后双链解旋变成单链 DNA; 经酸变性处理会使嘌呤-核糖键断裂, 脱去嘌呤. 从图 4 插图中鸟嘌呤的溶出峰高与热变性 DNA 浓度的关系可见, 单链 DNA 在电化学预处理玻碳电极上的吸附基本符合 Langmuir 吸附等温式, 与文献[22]的结论一致. 腺嘌呤的溶出峰高虽然也随着 DNA 浓度的增加而增大, 但变化不如鸟嘌呤明显, 因此很难根据腺嘌呤的溶出峰电流对 DNA 进行定量测定或判断 DNA 的吸附情况.

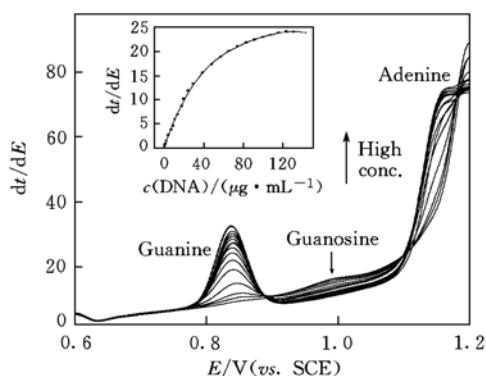


Fig. 4 Differential chronopotentiometric stripping curves of thermal-denatured DNA (1.0—130  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) at the electrochemically pretreated GCE

Inset: the plot of  $dt/dE$  of guanine with DNA concentration.

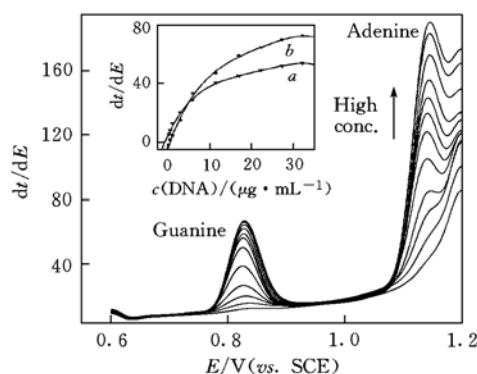


Fig. 5 Differential stripping curves of acid-denatured DNA (0.3—32.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) at the electrochemically pretreated GCE

Inset: the plot of  $dt/dE$  of guanine (a) and adenine (b) with DNA concentration.

由图 4 可见, 在约 1.0 V 处不很明显的峰应为鸟嘌呤核苷的氧化峰, 这也说明在单链 DNA 中, 以鸟苷形式吸附在电极表面的量比较少, 或者离电极表面的距离稍大. 因此可以认为, 单链 DNA 主要是通过碱基而不是通过糖环吸附在电极表面起到富集作用的.

由图 5 可见, DNA 经酸变性后, 游离的嘌呤吸附在电极表面可以得到很好的微分溶出峰, 鸟嘌呤的溶出峰高与加入 DNA 浓度的关系基本符合 Langmuir 吸附等温式, 而腺嘌呤的溶出峰高与加入 DNA 浓度的关系基本符合 Temkin 吸附等温式, 与文献[23]结论一致, 具体结果见表 2. 根据该线性关系可测定 DNA 中嘌呤碱基的浓度或其比值. 通过标准加入法计算出该酸变性 DNA 中鸟嘌呤与腺嘌呤的比值为 0.80, 与文献[24]报道的标准值(0.77)相近. 图 5 溶出曲线中没有鸟苷的峰, 说明在酸变性过程中, 嘌呤碱基已从 DNA 中脱掉, 溶液中不存在鸟苷.

Table 2 Relationships between stripping peak height of purine and DNA concentration

Sample	Linear equation	R	Linear range/( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )
Guanine in acid denatured DNA	$dt/dE = 0.8378 + 12.3052c$	0.999 2	0.30—2.50
Adenine in acid denatured DNA	$dt/dE = 57.6993 + 9.2758c$	0.999 3	0.59—6.80
	$dt/dE = 108.7843 + 1.7880c$	0.998 5	6.80—37.0
Guanine in thermal denatured DNA	$dt/dE = 0.6114 + 0.4996c$	0.998 6	1.00—20.0

## 3 结 论

恒电位电化学氧化法预处理玻碳电极方法简单, DNA 中的嘌呤碱基在预处理玻碳电极上吸附能力大大增强, 可得到其灵敏的微分计时电位溶出信号, 利用溶出峰高 ( $dt/dE$ ) 与浓度在一定范围内所呈现的线性关系, 可对嘌呤碱基及其核苷进行定量测定. 该方法用于酸变性 DNA 中鸟嘌呤与腺嘌呤的同时检测以及 DNA 浓度的测定, 可得到灵敏的溶出峰, 也可以为进一步研究 DNA 损伤的直接电化学检测提供重要信息.

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Brabec V. , Dryhurst G. J. . *Electroanal. Chem.* [J], 1978, **89**: 161—168
- [ 2 ] Oliveira-Brett A. M. , Vivan M. , Fernandes I. R. *et al.* . *Talanta*[J], 2002, **56**: 959—970
- [ 3 ] Pedano M. L. , Rivas G. A. . *Electrochem. Commun.* [J], 2004, **6**: 10—16
- [ 4 ] Sheng R. , Ni F. , Cotton T. M. . *Anal. Chem.* [J], 1991, **63**: 437—442
- [ 5 ] Wallace S. S. . *Free Radic. Biol. Med.* [J], 2002, **33**: 1—14
- [ 6 ] Cadet J. , Douki T. , Gasparutto D. *et al.* . *Mutat. Res.* [J], 2003, **531**: 5—23
- [ 7 ] Smith D. L. , Elving P. J. . *Anal. Chem.* [J], 1962, **34**: 930—936
- [ 8 ] Palecek E. , Jelen F. , Hung M. A. *et al.* . *Bioelectrochem. Bioenerg.* [J], 1981, **8**: 621—627
- [ 9 ] Percio A. M. . *Farias Talanta*[J], 2001, **55**: 281—290
- [ 10 ] Percio A. M. . *Farias Talanta*[J], 2003, **61**: 829—835
- [ 11 ] Anderson L. , Jagner D. , Josefson M. . *Anal. Chem.* [J], 1982, **54**: 1371—1376
- [ 12 ] Draback I. , Pfeiffer Madsen P. , Soerensen J. . *Int. J. Environ. Anal. Chem.* [J], 1983, **15**(3): 153—156
- [ 13 ] Palecek E. , Tomschik M. , Stankova V. *et al.* . *Electroanalysis*[J], 1997, **9**: 990—997
- [ 14 ] Xiaohua C. , Gustavo R. , Percio A. M. F. *et al.* . *Bioelectrochem. Bioenerg.* [J], 1996, **40**: 41—47
- [ 15 ] Marrazza G. , Chianella I. , Mascini M. . *Biosensors & Bioelectronics*[J], 1999, **14**: 43—51
- [ 16 ] Giovanna M. , Giacomo C. , Marco M. *et al.* . *Clinical Chemistry*[J], 2000, **46**: 31—37
- [ 17 ] Wang H. S. , Ju H. X. , Chen H. Y. . *Electroanalysis*[J], 2001, **13**: 1105—1109
- [ 18 ] Wang H. S. , Ju H. X. , Chen H. Y. . *Anal. Chim. Acta*[J], 2002, **461**: 243—250
- [ 19 ] Wang H. S. , Ju H. X. , Chen H. Y. . *Electroanalysis*[J], 2002, **23**: 1615—1620
- [ 20 ] Oliveira-Brett A. M. , Piedade J. A. P. , Silva L. A. *et al.* . *Analytical Biochemistry*[J], 2004, **332**(2): 321—329
- [ 21 ] Marmur J. , Rownd R. , Schildkraut C. L. . *Progress in Nucleic Acid Research*[M], New York: Academic Press, 1963
- [ 22 ] Brett C. M. A. , Oliveira Brett A. M. , *Electrochemistry Principles Methods and Applications*[M], New York: Oxford Science Publications Inc. , 1993
- [ 23 ] Oliveira Brett A. M. , Silva L. A. , Brett C. M. A. . *Langmuir*[J], 2002, **18**: 2326—2330
- [ 24 ] Davison N. . *The Biochemistry of the Nucleic Acids*, 7th Edition[M], Norfolk: Cox & Nyman, 1972

## Differential Chronopotentiometric Stripping Method for the Determination of Purines and DNA Concentration Using an Electrochemically Pretreated Glassy Carbon Electrode

JIA Wen-Li, LI Tian-Hua, ZHANG Jing-Jing, WANG Huai-Sheng\*  
(*Institute of Analytical Chemistry, College of Chemistry and Chemical Engineering,  
Liaocheng University, Liaocheng 252059, China*)

**Abstract** The differential chronopotentiometric stripping method was used for the sensitive and selective determination of DNA and purines bases or the nucleosides concentrations in 0.1 mol/L phosphate buffer solution with pH = 4.0 by using an electrochemically pretreated glassy carbon electrode. The results indicate that the electrochemically modified GCE could accumulate purines and ssDNA by effective adsorption and produce sensitive differential stripping peaks. The stripping peak heights ( $dt/dE$ ) were linear with the concentrations of purine bases and denatured DNA in the suitable range. Some useful information related to DNA damage could be also acquired.

**Keywords** DNA; Purine bases and the corresponding nucleosides; Electrochemically pretreated glassy carbon electrode; Chronopotentiometric stripping analysis

(Ed. : K, G)