文章编号:1000-5404(2007)05-0399-03

论著

适配子型压电石英晶体传感器探针固定方法的研究

齐永志,府伟灵,姚春艳 (第三军医大学西南医院检验科,重庆 400038)

提 要: 目的 比较金膜表面两种探针固定法的优劣,选择适配子型压电传感器探针固定的最佳方法。**方法** 用巯基固定法及生物素-亲和素固定法将针对人IgE的适配子探针固定在压电传感器的金膜表面,对不同浓度IgE引起的频率变化进行检测。**结果** 与巯基法相比,生物素-亲和素法固定探针压电传感器频率下降更为明显,检出限低,线性范围宽,0.1~2.5 mg/L浓度范围内IgE浓度与频率变化呈明显的线性相关,相关系数0.994 5。**结论** 在压电基因传感器探针固定中效果良好的巯基法在适配子探针固定中并不适用,生物素-亲和素法在适配子压电传感器探针固定中有明显优势。

关键词: 石英晶体微天平;传感器;适配子;探针
中图法分类号: R312;R392.1 **文献标识码**: A

Immobilization methods for probes of aptamer-based piezoelectric quartz crystal sensor

QI Yong-zhi, FU Wei-ling, YAO Chun-yan (Department of Clinical Laboratories, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To compare 2 methods to immobilize probes on the surface of gold membrane and select the better one for aptamer immobilization of aptamer-based piezoelectric quartz crystal sensor. **Methods** Anti-IgE aptamers were immobilized on the gold surface of piezoelectric quartz crystal sensor with thiol method or biotin-avidin method. The changes of frequency were compared in reactions with different concentrations of IgE. **Results** Biotin-avidin method obtained higher frequency changes in the reactions of IgE, lower limit of detection and wider liner range than thiol method. For biotin-avidin method, there was significant linear correlation between frequency changes and the concentration of IgE with the correlation coefficient of 0.994 5. **Conclusion** The thiol method which is proved effective for probe immobilization on gene sensor is unfit for aptamer immobilization. Biotin-avidin method has a better ability to immobilize probe on the surfaces of aptamer-based piezoelectric quartz crystal sensor.

Key words: quartz crystal microbalance; sensor; aptamer; probe

适配子是由指数级富集的配基系统进化技术(systematic evolution of ligands by exponential enrichment,SELEX)筛选产生的能与靶分子特异性结合的单链DNA或RNA片段。核酸适配子具有靶分子广、亲和力高、特异性强、易改造修饰的特点使其作为识别分子在毛细管电泳、生物传感器、分子信标、质谱分析多种技术平台中得以广泛应用[1]。适配子型压电传感器利用了适配子与靶分子的高度特异性结合性质,固定适配子分子作为识别分子捕获目标分子,通过晶体表面质量的增加引起石英晶体谐振频率的变化来传递反应信号。本实验在我室基因传感器探针固定研究基础上,在传感器表面采用巯基法、生物素-亲和素法两种方法固定适配子检测不同浓度的人IgE,选取更适合于适配子固定的方法。

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器

1.1.1 石英晶体传感器 AT切型石英晶振由信息产业部电子第26研究所生产制备,双面镀金电极,基频为10 MHz,晶体采用13 mm×13 mm的方片,金膜电极直径为4 mm。检测仪采用自激式振荡电路,2×5型阵列通道,频率信号为TTL电平

基金项目:国家自然科学基金(30400420)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30400420)
作者简介:齐永志(1979-),男,河北省秦皇岛市人,硕士研究生,技师,主要从事压电石英传感器方面的研究。电话:13368126009,E-mail:qyz_2002_zyq@sohu.com
通讯作者:府伟灵,E-mail:weilingfu@yahoo.com
收稿日期:2006-07-27;修回日期:2006-11-20

输出，台湾研华公司 PCL2836 型多功能计数卡、美国 Adink 公司的 ACL28454 型多功能计数卡。自行开发的频率采集分析软件 BiDe-211，具有实时检测频率并进行计数、差值显示频率、绘制数据图表、绘制检测趋势图等特点。

1.1.2 主要试剂 3,3'-二巯基丙酸(3,3'-dithiopropionic acid,DDPA)、1-乙基-3-(3-二甲氨丙基)碳二亚胺[1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropril) carbodiimide, EDC]、N-琥珀酰亚胺(N-hydroxysuccinimide, NHS)、亲和素、牛血清白蛋白(bovine serum albumin,BSA)均购自 Sigma 公司。根据文献[2]配置 PBS 缓冲液作为适配子结合缓冲液(pH 7.4，含 8.1 mmol/L Na_2HPO_4，1.1 mmol/L KH_2PO_4，1 mmol/L $MgCl_2$，2.7 mmol/L KCl，138 mmol/L NaCl)，Piranha 溶液为 30% H_2O_2、98% H_2SO_4 按 1:3混合配制，常规试剂均为分析纯级。

1.1.3 适配子探针与靶分子 选用已筛选出的适配子靶分子对[3]，人免疫球蛋白 E 及相应适配子，人 IgE 纯品购自美国 USBio 公司，适配子探针由军事医学科学院放射医学研究所合成，其序列为 5'-GGGGCACGTTTATCCGTCCCTCCTAGTG-GCGTGCCCC-3',5'端分别进行巯基和生物素修饰。

1.2 方法

1.2.1 石英晶体金膜表面预处理 将镀有金膜电极的石英晶体放入 1.0 mol/L NaOH 中浸泡清洗 20 min，取出后用去离子水清洗 3 次，然后将石英晶体放入 Piranha 溶液中处理 15 min，取出后立即将其投入无水乙醇中浸泡 5 min，氮气吹干备用。

1.2.2 适配子探针预处理 PBS 缓冲液溶解，95 ℃变性 3 min，迅速冰浴 2 min，随后进行探针固定。

1.2.3 巯基法探针固定 经过变性处理的巯基化适配子探针 10 μl 覆盖经预处理石英晶体金膜，根据本室前期研究结果[4]，适配子探针采用最佳浓度 1.0 μmol/L，2 h 后 PBS 缓冲液清洗 3 次，0.02% BSA 封闭约 1 h，PBS 缓冲液清洗。

1.2.4 亲和素法探针固定 将晶振浸入 10 mmol/L 的 DDPA 乙醇溶液 20 min，取出去离子水清洗，EDC(100 g/L)、NHS(100 g/L)混合液 20 μl 作用 20 min，去离子水清洗，100 μl 0.2 mg/ml 亲和素溶液作用 2 h，0.02% BSA 封闭约 1 h，生物素修饰的 2.0 μmol/L 适配子 10 μl 反应 1 h，PBS 缓冲液清洗。

1.2.5 人免疫球蛋白 E 的检测 将用两种方法固定探针的石英晶体分别加入到微阵列中调稳，每个检测池加入 90 μl 结合缓冲液，待频率稳定后记录基频 f1，加入 10 μl 不同浓度的人 IgE 标准品是其终浓度分别为 0.1、0.2、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mg/L，检测并记录适配子与 IgE 结合稳定后频率 f2，频率的变化 $\Delta f = f1 - f2$，通过检测其频率变化 Δf，比较两种固定方法对检测结果的影响，以结合缓冲液作为空白对照，各浓度实验重复 5 次进行统计分析。

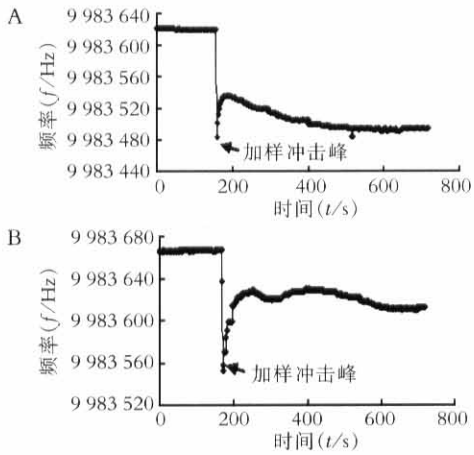
1.3 统计学分析

采用 SPSS 10.0 统计软件进行 t 检验及线性相关分析。

2 结果

2.1 适配子压电传感器检测 IgE 反应曲线

压电传感器可通过频率变化实时监测反应情况，图 1 为两种方法固定适配子对 2 mg/L 人 IgE 检测趋势图，其中频率开始下降为加样起始点。



A：亲和素法；B：巯基法

图 1 适配子压电传感器检测 IgE 反应曲线

2.2 两种固定方法对不同浓度 IgE 检测结果

亲和素法 6 个浓度点 IgE 检测响应信号均与巯基法有明显差异($P<0.05$)，巯基法除 0.5 mg/L 与 1.0 mg/L 浓度点有显著差异外，其余各相邻浓度之间无明显差异($P>0.05$)，具体结果见表 1。

表 1 两种方法固定适配子对 IgE 检测结果($\bar{x} \pm s$)

IgE 浓度(mg/L)	频率下降(Hz)	
	巯基法	亲和素法
0.5	27.4 ±9.1	37.8 ±4.5[a]
1.0	44.8 ±7.2	57.8 ±6.5[b]
1.5	54.6 ±10.7	84.4 ±6.4[b]
2.0	56.8 ±11.8	131.0 ±7.3[b]
2.5	66.8 ±10.7	150.8 ±10.4[b]
3.0	69.2 ±8.2	160.2 ±5.7[b]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与巯基法比较

2.3 两种固定方法检出限及检测范围比较

对低浓度 0.1 mg/L 和 0.2 mg/L IgE 进行检测，结果显示巯基法在 0.2 mg/L 时信号响应与 PBS 空白无明显差异($P>0.05$)。亲和素法在低浓度检测中信号响应明显，亲和素法 0～2.5 mg/L 浓度范围检测结果见图 2，以 PBS 空白 3 倍标准差反查 IgE 检测曲线得到理论上的最低检出限 0.055 mg/L。

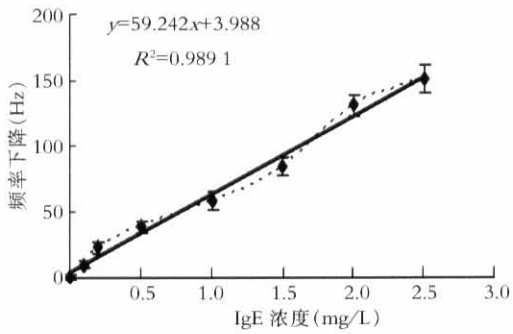


图 2 亲和素法固定适配子 IgE 检测标准曲线

3　讨论

为了提高压电传感器检测的灵敏度和重复性，金膜表面的修饰和识别分子固定一直是各实验室研究的重点，研究人员尝试采用各种物理化学方法来对晶体进行包被，如早期的物理吸附法及随后发展的巯基自组装法、蛋白A法等，本实验室在巯基化核酸探针自组装及蛋白A抗体固定等方面进行了较深入的研究[4,5]。巯基化合物自组装单分子层（self-assembled monolayer, SAM）技术在寡核苷酸探针固定中应用较成熟，该技术满足了压电传感器识别分子固定几个主要要求，包括和基底的牢固结合、可控制的分子取向有序排列、可控制的外表面性质及可控的厚度等方面，因此可适应不同修饰电极的要求。巯基自组装技术实现的途径主要有两种：一种方法是选择带合适的功能基团（如：－NH，－COOH，－OH 等）的化合物先在金膜上形成单分子层，再通过活性功能基团来进行下一步固定；另一种方法是将核酸探针标记上巯基基团，最后通过自组装来达到固定的效果。本实验采用的亲和素法和巯基法分别代表了巯基自组装技术的两种途径。

适配子与IgE实时反应曲线显示，亲和素法反应曲线圆滑，反应趋势明显，在开始的几分钟内频率下降明显，随后逐渐趋于平缓，反应达平衡后频率稳定在±1 Hz，巯基法反应曲线中间有波动，且频率下降明显小于亲和素法。实验结果显示巯基法明显不适用于适配子探针的固定，表现在低浓度检测信号响应差，1.0 mg/L后随IgE浓度增高频率下降改变不明显，检测的线性范围窄，同时各浓度点检测重复性差，如0.5 mg/L浓度时变异系数达到33.3%。与巯基法相比，亲和素法固定适配子检测IgE在各浓度点都有更高的频率下降，且各浓度点标准差相对较小，相关性分析表明IgE浓度与频率变化呈明显的线性相关，线性范围0.1～2.5 mg/L，最低检出限0.055 mg/L，换算为质量为5.5 ng，达到了传感器微量检测目的，所以选用亲和素法作为适配子固定方法。

本实验所采用的两种探针固定方法在普通核酸探针固定中应用广泛，且固定效果良好[6,7]，巯基法之所以不适用于适配子固定，与适配子检测特殊性有关。适配子本质上为寡核苷酸，但适配子与靶分子间的特异性识别依赖其单链分子形成的三维空间结构，此外本实验适配子的靶分子为蛋白，在检测靶蛋白时需用BSA封闭金膜上蛋白非特异性结合位点。巯基法固定适配子检测结果差与适配子固定后不能形成正确空间构象有密切关系，BSA封闭以及金膜表面空间位阻都可能影响适配子空间构想的形成，而亲和素法固定由于中间铺设了多层分子（DDPA、亲和素、生物素），适配子离开金膜已有几个纳米的距离，大大减小了BSA封闭以及表面空间位阻的影响。

参考文献：

[1] Tombelli S, Minunni M, Mascini M. Analytical applications of aptamers[J]. Biosens Bioelectron, 2005, 20(12): 2424－2434.

[2] Gokulrangan G, Unruh J R, Holub D F, *et al*. DNA aptamer-based bioanalysis of IgE by fluorescence anisotropy[J]. Anal Chem, 2005, 77(7): 1963－1970.

[3] Wiegand T W, Williams P B, Dreskin S C, *et al*. High-affinity oligonucleotide ligands to human IgE inhibit binding to Fc epsilon receptor I [J]. J Immunol, 1996, 157(1): 221－230.

[4] 陈　鸣，府伟灵，张　波，等. 基因传感器表面两种探针固定法的比较[J]. 第三军医大学学报，2002，24(1)：17－19.

[5] 姚春艳，府伟灵. 压电免疫传感器再生能力的试验研究[J]. 中华医院感染学杂志，2005，15(4)：367－372.

[6] Cho Y K, Kim S, Kim Y A, *et al*. Characterization of DNA immobilization and subsequent hybridization using *in situ* quartz crystal microbalance, fluorescence spectroscopy, and surface plasmon resonance [J]. J Colloid Interface Sci, 2004, 278(1): 44－52.

[7] Tombelli S, Mascini M, Turner A P. Improved procedures for immobilisation of oligonucleotides on gold-coated piezoelectric quartz crystals [J]. Biosens Bioelectron, 2002, 17(11－12): 929－936.

（编辑　汪勤俭）

参考文献中英文作者名的著录方法

医学期刊的论文中，引用英文文献的比例很高，但有不少作者将英、美人的姓名搞错，以至用光盘核对时出现错姓、错名或姓名全错。英、美人姓名的习惯写法是：名-名-姓，“名”可以有1个、2个或3个，但“姓”只有1个。因此，从书籍或期刊中的姓名转录到文献时，要将次序调整为姓-名-名。姓是不可以简写的；“名”可以缩写，用第一个字母大写，不用缩写点。数据库在著录作者姓名时，已经调整为姓-名-名，可照录。

例如：John Quincy Public 写为 Public J Q

本刊编辑部