文章编号:1000-5404(2009)09-0765-03

论著

乙型脑炎病毒靶序列浓度对 LSAW 基因传感器检测系统的影响

徐清华[1],陈 鸣[1],陈 伟[1],府伟灵[2],王云霞[2],丁 毅[3],施建峰[3],曹 亮[3],汪广杰[2] (第三军医大学:[1]大坪医院野战外科研究所检验科,重庆 400042,[2]西南医院检验科,重庆 400038;[3]中国电子科技集团公司第二十六研究所第五研究室,重庆 400060)

摘 要:目的 探讨乙型脑炎病毒(Japanese encephalitis virus, JEV)靶序列浓度值对漏声表面波(LSAW)基因传感器检测系统的影响。**方法** LSAW 基因传感器表面固定终浓度为 0.5 μmol/L 的 JEV 探针,然后用 pH 7.6 的 10 mmol/L PBS 缓冲液(含 Na^+ 0.3 mol/L)中和终浓度为 0.05、0.1、0.5、1.0、1.5、2.0 μmol/L 的 JEV 靶序列杂交,分别记录相位变化及反应所需时间。**结果** 与 JEV 探针反应引起的相位变化是先缓慢上升后趋于缓和的趋势,以 1.0 μmol/L 靶序列浓度为分界线;杂交平衡时间上除 0.05 μmol/L 的时间短以外,其他的未见明显变化趋势,当靶序列浓度为 1.0 μmol/L,杂交反应平衡时间为 33 min。**结论** 随着靶序列浓度的升高,杂交反应引起的相位变化呈典型的饱和曲线趋势;靶序列浓度为 1.0 μmol/L、杂交反应的平衡时间为 33 min,是 LSAW 基因传感器杂交的最适反应条件。

关键词: 漏声表面波;基因传感器;相位;乙型脑炎病毒;杂交
中图法分类号: R318.04; R373.31; R446.5 **文献标识码:** A

Concentrations of target sequence of Japanese encephalitis virus in LSAW gene sensor detection system

XU Qing-hua[1], CHEN Ming[1], CHEN Wei[1], FU Wei-ling[2], WANG Yun-xia[2], DING Yi[3], SHI Jian-feng[3], CAO Liang[3], WANG Guang-jie[2] ([1]Department of Clinical Laboratory Medicine, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042; [2]Department of Clinical Laboratory Medicine, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [3]Department 5, 26th Research Institute of China Electronics Technology Group Corporation, Chongqing 400060, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of different concentrations of target sequence of Japanese encephalitis virus (JEV) on the hybridization efficiency with leaky surface acoustic wave (LSAW) gene sensor detection system. **Methods** After 0.5 μmol/L JEV probe was firstly immobilized on the surface of LSAW gene sensor, JEV target sequence at different concentrations of 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, and 2.0 μmol/L was hybridized with the probe in pH 7.6 10 mmol/L PBS buffer (containing Na ionic concentrations of 0.3 mol/L), and then the changes of phase and equilibrium time of reaction were recorded and analyzed. **Results** Phase variation with JEV probe was gradually increased firstly and then in a steady trend when the concentrations of target sequence were changed from 0.05 to 2.0 μmol/L. Concentration of 1.0 μmol/L was determined as the watershed. No evident change was observed in equilibrium time for hybridization except for the concentration of 0.05 μmol/L. Equilibrium time of hybridization reaction was 33 min when the concentration of at JEV target sequence was 1.0 μmol/L. **Conclusion** The phase variation caused by hybridization reaction is saturation curve in accordance with the increase of target sequence concentration. Therefore, JEV target sequence at a concentration of 1.0 μmol/L and equilibrium time for 33 min in hybridization reaction are optimized work conditions for LSAW gene sensor.

Key words: leaky surface acoustic wave; gene sensor; phase; Japanese encephalitis virus; hybridization

流行性乙型脑炎是由乙型脑炎病毒,又称日本脑炎病毒(Japanese encephalitis virus,JEV)引起的中枢神经系统急性传染病。该病致死率高达 30% 左右,另有 50% 的患者会留下永久性的神经系统后遗症[1],是对人类造成危害的重大疾病之一。传统的病毒分离培养耗时长,不利于快速诊断,同时要严格考虑生物安全措施;血清学的诊断技术相对操作较为复杂,检查的是抗体,不利于早期诊断;PCR 方法仪器设备和试剂昂贵、操作过程中样品容易被污染、仅限于在大型的科研机

基金项目:国家高技术研究发展计划(863 计划)(2007AA02Z416);国家自然科学基金(30400107)
Supported by the National High Technology Research Development Program of China (863 Program, 2007AA02Z416) and the National Natural Science Foundation of China (30400107)
作者简介:徐清华,女,河北省元氏县人,硕士,主管技师,主要从事基因诊断和生物传感器方面的研究,发表论文 8 篇,现在白求恩国际和平医院遗传医学科。电话:(023)68757602,E-mail:xuqinghua2016@163.com
通信作者:陈 鸣, E-mail:chenming1971@yahoo.com
收稿日期:2008-11-05;修回日期:2008-12-05

构开展。因此,临床上迫切需要建立一种快速、无需标记、实时动态准确显示的测定方法[2]。生物传感器是检测领域中一门新兴高新技术,具有选择性好、灵敏度高、分析速度快、成本低、能在复杂的体系中进行在线连续监测的特点;它的高度自动化、微型化与集成化,减少了对环境和技术的要求,适合野外现场分析的需求,目前已成为生命科学领域的研究热点[3]。因此将新兴的漏声表面波(leaky surface acoustic wave, LSAW)传感器技术应用到基因检测中,构建一个高灵敏度的基因检测方法具有很大的应用价值。本研究设计了1个和乙型脑炎病毒特异性结合的DNA探针,固定在漏声表面波基因传感器金膜表面对乙型脑炎病毒进行检测。利用前期自行构建的LSAW检测系统,探讨乙型脑炎病毒不同靶序列浓度对检测系统的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 双通道漏声表面波生物传感器制作 由本室与中国电子科技集团公司第二十六研究所共同设计制作。传感器设计为双通道双端对谐振型结构,采用Y轴旋转36°切割X方向传播的钽酸锂($LiTaO_3$)单晶为基底,在同一块$LiTaO_3$晶体上同时镀制检测、参比两路谐振器,其中参比通道是为了减低非特异性物质的吸附,这种双通道检测技术可以有效去除外界环境的干扰[4]。两通道均是在真空环境下采用离子溅射的方法在反应区域表面镀制金膜,金膜和$LiTaO_3$晶体之间是一层铬膜,铬膜的作用是增加金在晶体表面的吸附。叉指换能器是用蒸发或溅射等方法先在基片表面沉积一层金属膜,再用光刻方法刻出叉指电极的图形,它是产生和接受声表面波的装置。

1.1.2 网络分析仪 由日本Advantest公司生产的R3767CG型多功能分析仪。

1.1.3 LabView分析软件及数据采集系统 由本室与中国电子科技集团公司第二十六研究所合作研制双通道双端对谐振型LSAW传感器的两路振荡信号输入至鉴相器,通过相位的变化可直接反映出质量负载的变化。

1.1.4 主要试剂 PBS缓冲液:pH 7.6、10 mmol/L(含Na^+ 0.3 mol/L)(本室自制),超纯水(本室自制),piranha溶液:按30% H_2O_2: H_2SO_4 = 1∶3的比例自行配制;JEV探针序列:5′端带有巯基基团的探针P,序列为5′ SH-$(CH_2)_6$-AAACACTTG-GTGAACGGCTC-3′;针对探针序列设计的JEV靶序列T:5′-GG-GGTCTTCAACTCCATAGGAAGAGCCGTTCACCAAGTGTTT-3′,以上序列均由上海生工公司合成。0.05、0.1、0.5、1.0、1.5、2.0 μmol/L浓度的JEV靶序列由本室自制。其余常规试剂均为分析纯级。

1.2 实验方法

1.2.1 $LiTaO_3$晶振金膜表面的预处理 在金膜表面滴加piranha溶液(30% H_2O_2: H_2SO_4 = 1∶3),浸泡10 min后,超纯水清洗3遍;然后用1 mol/L NaOH溶液浸泡10 min后,超纯水清洗3遍;然后用1 mol/L HCl溶液浸泡10 min后,超纯水反复清洗,氮气吹干,备用。

1.2.2 杂交反应 传感器检测通道中固定好JEV探针后(探针终浓度为0.5 μmol/L),吸干缓冲液,PBS缓冲液清洗3次,氮气吹干。将制备好的漏声表面波传感器以同轴电缆线联入网络分析仪测试系统,空气中稳定30 min,在检测和参比2个通道中加入pH 7.6的10 mmol/L PBS缓冲液(含Na^+ 0.3 mol/L)80 μl,稳定30 min,分别加入终浓度为0.05、0.1、0.5、1.0、1.5、2.0 μmol/L的JEV靶序列进行杂交反应,计算机自动采集记录相位数据。每一靶序列浓度值重复4次,取平均值。

1.3 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 不同JEV靶序列浓度对LSAW基因传感器相位变化的影响

由表1可以看出,随着JEV靶序列浓度从0.05 μmol/L到2.0 μmol/L,杂交反应引起的相位变化呈先缓慢上升后趋于缓和的趋势,以1.0 μmol/L靶序列浓度为分界线。不同JEV靶序列浓度与探针杂交反应在1.0 μmol/L浓度时引起的相位变化值最大,继续增大靶序列浓度,传感器相位无显著性变化。

表1 不同JEV靶序列浓度对传感器杂交相位的影响($\bar{x} \pm s$)

JEV靶序列浓度(μmol/L)	相位变化值(°)	杂交平衡时间(t/min)
0.05	0.95 ± 0.16[a]	20.60 ± 0.89[b]
0.1	1.08 ± 0.27[b]	30.00 ± 8.12
0.5	1.12 ± 0.22[b]	34.60 ± 11.32
1.0	1.43 ± 0.15	33.25 ± 7.72
1.5	1.22 ± 0.20	37.80 ± 10.71
2.0	1.22 ± 0.22	37.00 ± 3.81

a: $P<0.01$, b: $P<0.05$,与1.0 μmol/L比较

2.2 不同JEV靶序列浓度对LSAW基因传感器杂交平衡时间的影响

由表1可以看出,固定相同浓度探针后,随着不同靶序列浓度的增加,杂交平衡时间除0.05 μmol/L的时间短($P<0.05$)以外,其他的未见明显变化趋势。

2.3 LSAW基因传感器杂交反应时间的确立

相同浓度的探针固定好后,加入1.0 μmol/L JEV靶序列与之杂交,观察LSAW基因传感器的相位变化,直到相位稳定(相位变化<0.05°),继续观察10 min,LSAW基因传感器的相位随时间变化趋势见图1。结果表明,JEV靶序列与探针杂交反应在33 min已达平衡,继续检测,相位基本上无变化。

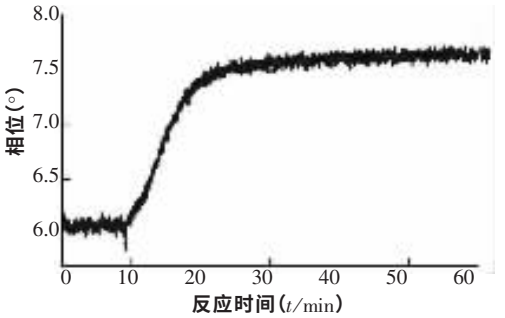


图1 LSAW基因传感器相位随时间变化趋势图
(靶序列浓度为1.0 μmol/L)

3　讨论

LSAW 传感器是继陶瓷、半导体、光纤等传感器之后逐步发展起来的一种新型传感器。它利用了压电晶体的特殊切向(如 Y 轴旋转 36°切割 X 方向传播的 $LiTaO_3$晶体)激励出 LSAW[5],当 LSAW 传播路径表面的质量负载发生微小改变时(靶序列与固定的探针发生反应),传感器表面的边界条件将发生改变,导致 LSAW 传播的频率和相位发生相应的改变,此时从传感器输出换能器提取的电信号的相位和频率即可随之发生变化,从而可极为敏感地探测出与传感器晶体表面固定的探针发生特异性反应的待测靶序列。通过测量频率或相位的改变,从而达到检测晶体表面附着质量的微小变化。与其他传感器相比,LSAW 传感器不仅具有结构小、耗功少、灵敏度高、分辨率好等优点,而且对电、热、力、声学及生物等多种因素较敏感。LSAW 技术制成的传感器,工作时以频率或相位信号输出,不需经过模/数转换便可与计算机接口,因而精密度更高。LSAW 器件采用平面制作工艺,极易集成化,结构牢固,重复性和可靠性较好[6]。目前 LSAW 传感器被广泛地用于测量力、压力、温度、湿度和多种气体[7],但在医学领域中仍处于试验的研发阶段。本实验室在前期研究中成功构建了延迟线型 LSAW 传感器,应用于人乳头瘤病毒的检测[8]。为了进一步提高 LSAW 传感器的检测敏感性和特异性,使 LSAW 传感器更适用于临床检测需要,我们对传感器进行了改进,由延迟线型改为双端对谐振型结构,选用了 JEV 作为探针,构建了新型的 LSAW 双端对谐振型结构传感器检测系统。

在杂交反应中,靶序列的浓度值是最重要的影响因素之一。本实验结果显示,JEV 靶序列浓度从 0.05 ~2.0 μmol/L,杂交反应引起的相位变化是先缓慢上升后趋于缓和的趋势,呈一典型的饱和曲线的方式,以 1.0 μmol/L 靶序列浓度为分界线。在靶序列浓度逐渐升高的过程中,固定的 JEV 探针也逐渐结合上更多的靶序列,从而引起更高的相位变化效应,当靶序列浓度升高至 1.0 μmol/L 时,固定的 0.5 μmol/L 探针已经被全部饱和,因此当继续增加靶序列的浓度时,已经无法引起更大的相位值变化,所以我们选用 1.0 μmol/L 作为 JEV 靶序列的最适杂交浓度,与陈鸣等[9,10]报道一致。

本研究结果显示,靶序列浓度除在 0.05 μmol/L 时杂交反应平衡时间短外,其余的没有显示出一定的变化趋势,说明杂交平衡时间不会因靶序列浓度的增加而改变。观察 JEV 靶序列浓度 1.0 μmol/L 时杂交的平衡时间,从图 1 可以看出,当反应进行到 33 min 时,LSAW 基因传感器相位变化达到稳定(相位变化 <0.05°),继续观察 10 min, 其相位基本上无变化,表明杂交反应已经达到平衡,因此本研究选取 33 min 作为 LSAW 基因传感器杂交平衡时间。

Rapp 等[11]对 SAW 延迟线型和谐振器型振荡器的性能进行了比较,发现 SAW 谐振器具有如下特点:一是插损要小得多;二是尺寸很小;三是调频范围比延迟线窄,增加调频范围会降低稳定度,所以谐振器型振荡器具有更高的振荡频率、窄带宽、高 Q 值及更低的插损,从而提高了传感器的灵敏度、分辨率及稳定性。与延迟线型相比,改进后传感器插损小、信噪比高、杂交反应的响应时间明显缩短[8,12]。尽管目前 LSAW 传感器仍在研发阶段,但随着认识的不断深入和关键工艺技术瓶颈的不断克服,加上与纳米生物技术和纳微电子加工技术等先进的科学技术相结合,它会因其具有灵敏度高,特异性好,操作简单,不需要任何标记,检测速度快,成本低廉,仪器体积小,质量轻,能实时在线检测的优点在临床基因检测中发挥其重要作用。

参考文献:

[1] Diagana M, Preux P M, Dumas M. Japanese encephalitis revisited [J]. J Neurol Sci, 2007, 262 (1 - 2): 165 - 170.

[2] Yang J, Yang T, Feng Y, *et al*. A DNA electrochemical sensor based on nanogold-modified poly-2, 6-pyridinedicarboxylic acid film and detection of PAT gene fragment [J]. Anal Biochem, 2007, 365(1): 24 - 30.

[3] Teles F R R, Fonseca L P. Trends in DNA biosensors[J]. Talanta , 2008, 77(2): 606 - 623.

[4] 杨　楷, 李志刚, 景玉鹏, 等. 声表面波气体传感器的研究进展[J]. 电子元件与材料,2008, 27(9): 26 - 30.

[5] Chung C J, Kao K S, Cheng C C, *et al*. Proton-exchanged 36 degrees Y-X $LiTaO_3$ waveguides for surface acoustic wave[J]. IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control, 2006 , 53(2): 502 - 505.

[6] Gamble K J, Malocha D C. Simulation of short LSAW transducers including electrode mass loading and finite finger resistance [J]. IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control, 2002, 49 (1): 47 - 56.

[7] Fernandez M J, Fontecha J L, Sayago I , *et al*. Discrimination of volatile compounds through an electronic nose based on ZnO SAW sensors [J]. Sens Actuators B Chem, 2007, 127(1): 277 - 283.

[8] 王云霞, 府伟灵, 陈　鸣, 等. 新型漏声表面波生物传感器液相检测条件的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(9): 910 - 912.

[9] 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.

[10] 陈　鸣,陈　伟,府伟灵,等.缓冲液离子浓度对新型 PNA-LSAW 基因传感器杂交效应的影响[J].重庆医学,2008,37(17):1939 - 1940.

[11] Rapp M, Reibel J, Stahl, U, *et al*. Influence of phase position on the chemical response of oscillator driven polymer coated SAW resonators [C]. IEEE UFFC, 1998: 621 - 629.

[12] 付曙霞,杨震夏. 声表面波气体传感器器件的设计[J]. 舰船科学技术, 2006, 28(2): 72 - 75.

(编辑　汪勤俭)