文章编号:1000-5404(2009)11-1013-04

论著

漏声表面波传感器生物信号放大系统的研究

王云霞[1],张立群[1],罗 阳[1],丁 毅[2],施建峰[2],徐清华[3],汪广杰[1],曹 亮[3],陈 鸣[3],府伟灵[1] (第三军医大学:[1]西南医院检验科,重庆 400038,[3]大坪医院野战外科研究所检验科,重庆 400042;[2]中国电子科技集团公司第二十六研究所五室,重庆 400060)

摘 要:目的 研究利用"RecA蛋白-互补单链DNA"探针与bis-PNA/dsDNA复合物相结合,作为生物信号放大系统提高传感器检测灵敏度的可行性。**方法** 漏声表面波传感器检测通道金膜表面先固定针对人乳头瘤病毒(HPV)的bis-PNA探针,加入HPV基因组DNA与之完全反应后,再加入不同浓度的"RecA蛋白-互补单链DNA"探针,在反应过程中加入ATPγS提供能量,分别探索优化RecA蛋白及ATPγS的最佳反应浓度。**结果** 当RecA蛋白浓度为45 μg/ml,所引起的相位变化值为(11.74±1.03)°,显著高于其他浓度组($P<0.01$);在最佳RecA蛋白浓度下,当ATPγS浓度为2.5 mmol/L时,所引起的相位变化值为(10.71±0.73)°,显著高于其他ATPγS浓度组($P<0.01$)。**结论** "RecA蛋白-互补单链DNA"探针复合体与bis-PNA/dsDNA复合物相结合可以有效提高传感器的检测灵敏度,并明显缩短检测时间。

关键词: 漏声表面波;传感器;肽核酸;RecA蛋白;灵敏度
中图法分类号: R318.04; R394-33; R446 **文献标识码:** A

Study on biological signal amplification system of leaky surface acoustic wave sensor

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

Abstract: Objective To study the feasibility of combination of "RecA protein-complementary single strand DNA" probe and bis-PNA/dsDNA complexes as the biological signal amplification system for the improvement of the sensitivity of leaky surface acoustic wave bis-peptide nucleic acid biosensor. **Methods** Bis-PNA probe for detecting human papilloma virus (HPV) was immobilized on the surface of gold membrane of the detection channel. After the probe was hybridized with the corresponding target DNA completely, different concentrations of "RecA protein-complementary single strand DNA probe" were added to react with bis-PNA/dsDNA complexes. **Results** The phase shift value was (11.74±1.03) deg at the concentration of 45 μg/ml of RecA protein, significantly different as compared with other concentrations ($P<0.01$). At the optimal concentration of RecA protein, the phase shift value was (10.71±0.73) deg at the concentration of 2.5 mmol/L of ATPγS, significantly different as compared with other concentrations ($P<0.01$). **Conclusion** Combination of "RecA protein-complementary single strand DNA probe" and bis-PNA/dsDNA complexes contributes to effective improvement of the sensitivity and significantly shortened detection time.

Key words: leaky surface acoustic wave; sensor; peptide nucleic acid; RecA protein; sensitivity

随着分子生物学技术的发展,基因快速检测已成为临床病原学早期诊断的重要手段之一。近年新发展起来的漏声表面波(leaky surface acoustic wave, LSAW)生物传感器能够实现多种理化信息的快速敏感检测[1,2],针对待检靶DNA设计的检测探针可以提高传感器的特异性。与传统的DNA探针不同,本实验中我们设计合成了更稳定更特异的肽核酸(peptide nucleic acid, PNA)探针。PNA是人工合成的DNA模拟物,其中双体肽核酸(bis-PNA)更是以"链侵袭"的

基金项目: 国家863探索导向性课题(2007AA02Z416);国家863计划重点项目(2007AA022005);国家自然科学基金(30400107)
Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program, 2007AA02Z416, 2007AA022005) and the National Natural Science Foundation of China (30400107)

作者简介: 王云霞,女,安徽省颍上县人,博士研究生,助理实验师,主要从事生物传感器方面的研究,发表论文9篇。电话:(023)68754429, E-mail:wang52306@tom.com
通信作者: 府伟灵,电话:(023)68754429, E-mail: weilingfu@yahoo.com
陈 鸣,电话:(023)68757062, E-mail: chenming1971@yahoo.com

收稿日期: 2009-02-25;**修回日期:** 2009-03-16

方式与双链 DNA 形成稳定性更高的四链体结构,可直接检测 DNA 靶序列[3]。为了进一步提高传感器检测的灵敏度,本研究将“RecA 蛋白-互补单链 DNA 探针”引入到 LSAW-bisPNA 生物传感器检测系统,利用 RecA蛋白可以促使同源 DNA 分子碱基配对的原理,提高传感器表面的质量负载,从而提高传感器的检测灵敏度,使检测系统更加适用于微量临床病原微生物的基因检测。

1 材料与方法

1.1 实验仪器与试剂

1.1.1 双通道 LSAW 传感器的制作 由本室与中国电子科技集团公司第 26 研究所共同研制,设计为对端双谐振型传感器。即在同一块钽酸锂($LiTaO_3$)晶体上同时镀制检测、参比两路谐振器,每个通道由一个漏声表面波谐振器构成。$LiTaO_3$ 晶体为 Y 方向切割 36°旋转、X 方向传播 LSAW,通过记录相位变化来检测探针与靶序列的杂交反应。金膜和 $LiTaO_3$ 晶体之间是金属铬。叉指换能器是用真空镀膜的方法先在基片表面镀制一层金属膜,再利用光刻技术刻出叉指电极的图形。

1.1.2 相位记录分析软件及数据采集系统 相位记录分析软件及数据采集系统使用多功能网络分析仪(日本 ADVANTEST 公司 R3767CG 型)采集分析实验数据;GPIB 仪器控制卡(美国 Agilent 公司)传送命令至网络分析仪;自行研发的相位采集分析软件 BSMS 1.0 具有实时记录变化、自动绘制相位变化趋势图及分析结果等功能。

1.1.3 主要试剂 PBS 缓冲液:含 1 mmol/L EDTA,Na^+ 浓度为 20 mmol/L,pH 6.6(自行配制);超纯水(本室自制);Piranha 液:按(30% H_2O_2):(浓 H_2SO_4) = 1∶3 自行配制;bis-PNA 探针序列:5′-SH-$(CH_2)_6$-$(Lys)_3$-TTTTCTTCCT -$(egl)_3$-TCCTTCTTTT-Lys (SH 为巯基,Lys 为赖氨酸,egl 为 linker 分子),由成都川抗派德生物医药科技有限公司合成;pBR322-HPV18 质粒购自美国 ATCC 公司;质粒抽提试剂盒购自博大泰克,胶回收试剂盒购自 Omega 公司;*Eco*R Ⅰ酶购自 TaKaRa 公司;RecA 蛋白购自 New England Biolabs 公司;腺苷[5′-O-(3-THIOTRIPHOSPHATE) TETR, ATPγS]购自 Sigma 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 HPV 基因组 DNA 抽提 pBR322-HPV18 质粒含有 HPV 全基因组,经过质粒抽提、*Eco*R Ⅰ酶切、回收 HPV 全基因组等步骤提取 HPV 基因组 DNA,具体步骤按试剂盒操作说明进行。

1.2.2 $LiTaO_3$ 晶振金膜表面预处理 在金膜表面滴加少许 Piranha 液,浸泡 10 min 后,超纯水反复清洗,再分别用 1 mol/L NaOH 和 1 mol/L HCl 浸泡 10 min,超纯水反复清洗,氮气吹干备用。

1.2.3 双通道 LSAW 传感器稳定性检测 在室温 20 ℃时,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,检测两路谐振器的插入损耗,将其损耗调整至最小。

1.2.4 探针固定 传感器在空气中稳定 30 min 后,检测和参比 2 个通道分别加入 pH 6.6,Na^+ 浓度为 20 mmol/L 的 PBS 溶液 20 μl,稳定 30 min,检测通道加入 5 μl 终浓度为 2.0 μmol/L 的 bisPNA 探针。用巯基固定法将 HPV 的探针固定在传感器检测通道的金膜表面,1 h 后吸干缓冲液,去离子水清洗 3 遍,氮气吹干。回到空气中稳定至平衡。参比通道不固定任何探针。

1.2.5 RecA 蛋白和 ssDNA 的预处理 20 μl ssDNA (10 μmol/L)加 60 μl 去离子水,80 ℃水浴 3 min,4 ℃冷却 2 min,然后取14 μl加 7.0 μl 缓冲液(50 mmol/L Tris-Acetate,pH 7.5;250 mmol/L 乙酸钠,pH 7.0;10 mmol/L 乙酸镁,5 mmol/L DTT)和 2.5 mmol/L ATPγS 3.5 μl,室温下静置5 min。随后在此体系中再加入 0.5 μl RecA 蛋白(浓度分别为 15、30、45、60、75 μg/ml),37 ℃水浴 15 min。

1.2.6 RecA 蛋白最佳浓度的选择 检测通道和参比通道分别加入含上述 PBS 缓冲液 20 μl,稳定 10 min 后,2 个通道各加入 20 μl 终浓度为 100 μg/ L 的靶序列溶液和预先处理的不同浓度的“RecA 蛋白-互补单链 DNA 探针”进行杂交反应。在阴性对照实验中 2 个通道加入 pH 6.6 的 PBS 缓冲液。观察反应平衡时间及引起的相位变化值,实验重复 3 次取平均值。

1.2.7 ATPγS 的最佳浓度的选择 待确定 RecA 蛋白为 45 μg/ml 为最佳反应浓度时,加入浓度分别为 0.25、0.5、1.5、2.5、3.5、4.5 mmol/L 的 ATPγS 于“RecA 蛋白-互补单链 DNA 探针”反应体系。2 个通道加入 pH 6.6 的 PBS 缓冲液作为阴性对照。观察反应平衡时间及引起的相位变化值以确定最佳反应浓度,实验重复 3 次取平均值。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计分析软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 RecA 蛋白的最佳反应浓度

单因素方差分析显示,不同浓度的 RecA 蛋白形成的“RecA 蛋白-互补单链 DNA 探针”加入反应体系后引起的传感器相位变化值和杂交平衡时间不同,具体结果见表 1。随着 RecA 蛋白浓度从 15 μg/ml 增加到 75 μg/ml,传感器的相位变化值出现了先升高后下降的趋势,当浓度为 45 μg/ml 时引起的反应效果最为显著($P<0.01$),且相位变化值与平衡时间的比值也远远高于其他 RecA 蛋白浓度组,而杂交平衡时间总体上未有明显的变化趋势($P>0.05$)。因此综合考虑,以 RecA 蛋白浓度为 45 μg/ml 时得到的结果较为理想。

表 1 不同 RecA 蛋白浓度对传感器杂交效应的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	相位变化(°)	平衡时间(min)	相位变化/平衡时间(°/min)
PNA 组	2.97 ±0.19[a]	58.53 ±11.33	0.05
PNA + RecA 组			
15 μg/ml	3.52 ±0.27[a]	56.97 ±10.91	0.06
30 μg/ml	4.42 ±0.25[a]	51.83 ±11.77	0.09
45 μg/ml	11.74 ±1.03	49.27 ±8.56	0.24
60 μg/ml	6.82 ±0.47[a]	63.07 ±12.06	0.11
75 μg/ml	5.41 ±0.39[a]	52.07 ±8.96	0.10

a:$P<0.01$, 与 PNA + RecA 组 45 μg/ml 比较

2.2　ATPγS 最佳反应浓度的确定

在 RecA 蛋白最佳反应浓度下,通过单因素方差分析确定最佳 ATPγS 浓度。随着 ATPγS 浓度从 0.25 mmol/L 增加到 2.5 mmol/L,杂交反应引起的相位变化值逐渐增高($P<0.01$),当浓度从 2.5 mmol/L 升到 4.5 mmol/L 时,杂交反应引起的相位变化值依次降低($P<0.01$),而杂交平衡时间未有明显变化($P>0.05$)。综合分析,以 2.5 mmol/L 的 ATPγS 为最佳浓度。见表 2。

表 2　不同 ATPγS 蛋白浓度对传感器杂交效应的影响($\bar{x}\pm s$)

ATPγS 浓度(mmol/L)	相位变化(°)	平衡时间(min)
0.25	3.23 ± 0.24[a]	43.87 ± 7.20
0.5	4.10 ± 0.20[a]	52.04 ± 6.56
1.5	5.31 ± 0.69[a]	54.76 ± 5.57
2.5	10.71 ± 0.73	50.33 ± 8.05
3.5	6.78 ± 0.51[a]	48.10 ± 7.49
4.5	5.84 ± 0.33[a]	66.75 ± 5.54

a:$P<0.01$,与 ATPγS 2.5 mmol/L 比较

2.3　优化反应体系后对杂交灵敏度的影响

相同条件的 bis-PNA 探针固定后,加入 100 μg/L 与之进行杂交反应,58 min 后杂交反应达到平衡,杂交反应前后相位值变化大约 3.2°(图 1)。加入"RecA 蛋白-互补单链 DNA"探针后,相位值变化大约 10.1°,而反应平衡时间为 50 min(图 2)。在阴性对照实验中,杂交反应前后相位值基本没有变化(图 3)。

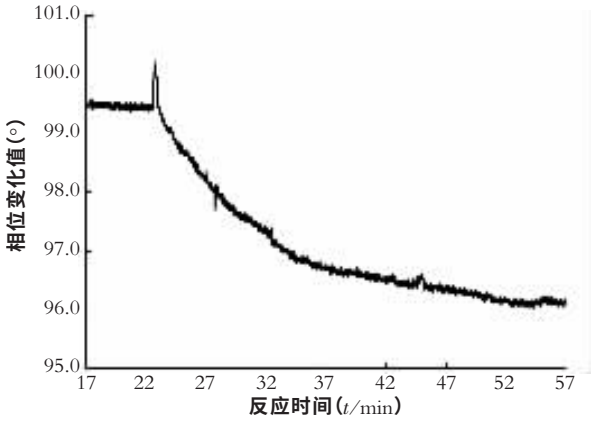


图 1　传感器检测 HPV 的相位变化

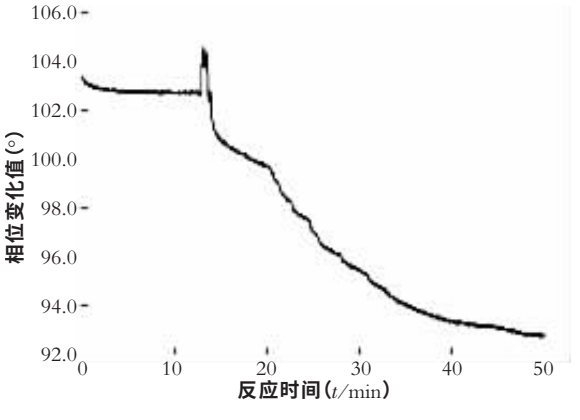


图 2　RecA-ssDNA 修饰后检测 HPV 的相位变化

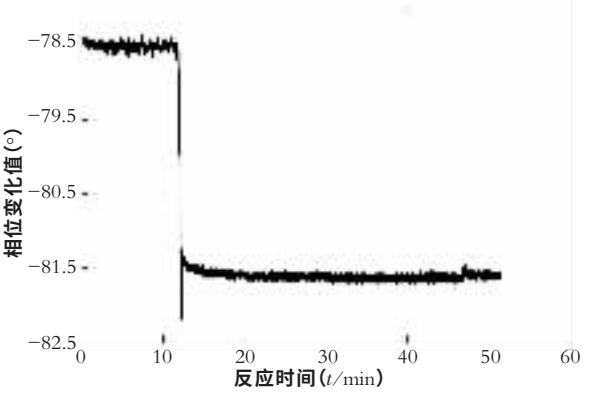


图 3　阴性对照实验检测传感器的相位变化

3　讨论

生物传感器由于集高效、灵敏、特异、结构小巧、经济实用等优点于一身,目前已成为生命科学领域的研究热点。它利用各种类型的换能器,将待测的生物信号转换为电、声、光等可检测的物理信号,从而实现对样本中靶生物分子的检测。自从 Sauerbrey 提出用体波模式的压电石英晶体传感器检测质量吸附以来,体波模式生物传感器的研究与应用日趋成熟。但是体波传感器震荡频率是靠晶体的厚度振动,这在客观上限制了体波传感器最低检测限的进一步提高。其后,众多研究者不断优化、改进杂交条件使压电生物传感器的检测性能大大提高[4-6],但传感器灵敏度的大小主要由压电晶体的基频高低来决定,基频越高,传感器的灵敏度越高。但随着基频增高,制作工艺对传感器信号的影响也会显著增加,从而在一定程度上影响了检测精确度[7]。相对于其他类型传感器而言,LSAW 基因传感器具有灵敏度和精密度高、重复性和可靠性好等优点[8,9]。本研究创新性地将 LSAW 传感器的检测系统制备成双端对谐振型,在检测过程中参比通道可有效减低非特异性因素的影响。对于病原微生物检测来说,由于所检测的基因组 DNA 质量微小,其杂交反应引起的相位变化值也较小。因此如何将信噪比放大,提高检测灵敏度成为改进传感器检测方法的目标之一。信号放大系统是提高生物传感器检测灵敏度的关键技术,在生物反应微小信号的检测中具有重要意义。

RecA 蛋白是 RecA 基因的产物,为含 4 个亚基的四聚体。RecA 蛋白具有和双链 DNA 及单链 DNA 的结合活性,在对原核生物 DNA 损伤的修复和同源重组中起重要作用。RecA 蛋白有 2 个 DNA 结合位点,在离体条件下,不借助其他任何蛋白的帮助,RecA 蛋白即能迅速启动同源 DNA 分子的联会,启动双链 DNA 分子中的 1 条链与来自另一分子的 1 条链交换,产生异源双链 DNA 分子。ATPγS 是 ATP 类似物,RecA 蛋白聚集在 ssDNA 上形成核酸蛋白丝复合物的过程需要 ATPγS 水解供应能量。因此,在确定最佳 RecA 蛋白反

应浓度的基础上,选择适当的 ATPγS 浓度非常重要。

本实验中,我们参照 Belotserkovskii 等[10]的研究结果,设计了针对人 HPV 全基因组序列的 2 条互补ssDNA 序列紧邻于 bis-PNA 探针的左端,然后将 RecA 蛋白与2段 ssDNA 进行预处理,使 2 段 ssDNA 与RecA蛋白结合,形成"RecA 蛋白-互补单链 DNA 探针",并对不同浓度的 RecA 蛋白和 ATPγS 加入反应体系后引起传感器的相位变化值和杂交平衡时间进行了统计分析。实验结果显示,当 RecA 蛋白浓度为 45 μg/ml,ATPγS 浓度为 2.5 mmol/L 时,与其他浓度组相比,引起的相位变化值最大($P<0.01$),为(11.74 ± 1.03)°。而且相位变化值与平衡时间的比值也远远高于其他浓度组,和 bis-PNA 探针与靶序列 DNA 直接进行杂交反应相比,传感器的响应相位、信噪比和检测灵敏度均有显著提高。

本研究中利用 RecA 蛋白的特性,将"RecA 蛋白-互补单链 DNA 探针"生物信号放大系统应用于 LSAW-bisPNA 生物传感器,不仅具有灵敏度高、特异性好、实时检测等优点,而且与普通的生物传感器相比成本低廉、操作简单。此外,由于该方法的信号放大效率较高,可以考虑在进一步的优化实验中缩短杂交反应时间,提高检测效率,为临床标本的基因快速检测奠定坚实的基础。

参考文献:

[1] Chiu C S, Gwo S. Quantitative surface acoustic wave detection based on colloidal gold nanoparticles and their bioconjugates[J]. Anal Chem, 2008, 80(9): 3318 - 3326.

[2] Lange K, Rapp B E, Rapp M. Surface acoustic wave biosensors: a review[J]. Anal Bioanal Chem, 2008, 391(5): 1509 - 1519.

[3] Panyutin I G, Panyutin I V, Demidov V V. Targeting linear duplex DNA with mixed-base peptide nucleic acid oligomers facilitated by bis-PNA openers[J]. Anal Biochem, 2007, 362(1): 145 - 147.

[4] 陈 鸣,府伟灵,吴 蓉,等. 肽核酸压电基因传感器新型生物信号放大系统的研究[J]. 中华检验医学杂志,2005,28(11):1193 - 1196.

[5] Zhang B, Zhang X, Yan H H, *et al*. A novel multi-array immunoassay device for tumor markers based on insert-plug model of piezoelectric immunosensor[J]. Biosens Bioelectron, 2007, 23 (1): 19 - 25.

[6] Yao C, Zhu T, Tang J, *et al*. Hybridization assay of hepatitis B virus by QCM peptide nucleic acid biosensor[J]. Biosens Bioelectron, 2008, 23 (6): 879 - 885.

[7] 夏 涵,黄君富,姚春艳,等. 基于 HRP-DAB 信号放大系统的压电石英晶体 DNA 传感器微阵列检测表皮葡萄球菌的研究[J]. 中华医院感染学杂志,2008,18(3):316 - 319.

[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] 张 烨,府伟灵,陈 鸣,等. 缓冲液 pH 值对 LSAW-bisPNA 传感器检测系统的影响[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(12): 1161 - 1163.

[10] Belotserkovskii B P, Zarling D A. Peptide nucleic acid (PNA) facilitates multistranded hybrid formation between linear double-stranded DNA targets and RecA protein-coated complementary single-stranded DNA probes[J]. Biochemistry, 2002, 41(11): 3686 - 3692.

(编辑 汪勤俭)

《军事预防医学》喜获中国出版界大奖

日前,根据中共中央宣传部的批复,由中国出版工作者协会举办的中国出版界的最高奖——第二届"中华优秀出版物奖"在北京举行颁奖大会。由我校军事预防医学院全军复合伤研究所名誉所长程天民院士主编、人民军医出版社出版的《军事预防医学》喜获殊荣。这是该书继 2008 年获第六届全军图书奖后又一全国大奖。

《军事预防医学》是由程天民院士主编,组织全军数十位专家共同完成的军事预防医学权威性著作。该专著以我国、我军在军事预防医学研究领域的资料为主体,特别展现了第三军医大学多年来取得的研究成果,同时又充分吸取国外先进经验,系统阐述了军事预防医学的基础理论、基本技术和发展趋势。内容体系分设 78 章,包括军事预防医学的概念、任务和历史作用,现代科技、社会发展和新军事变革对军事预防医学的影响,军事预防医学的组织管理和法规标准,特殊环境、特殊军事作业对健康的影响及卫生防护,军队特殊营养与食品卫生,高技术武器伤害及医学防护,战时主要疾病及其预防,突发公共卫生事件应急对策,重要军事活动中的卫生保障,军队健康教育内容与方法,以及军事预防医学的基本技能。这是一部权威、先进、实用的军事预防医学著作,不仅适用于各级军医和各级卫生领导干部学习,更可供专门从事预防医学研究人员参考。内容体现平战结合、军民兼用,不仅能为地方高校公卫学院及各级疾病预防控制中心学习参考,更是未来高科技战争战伤救治、战备训练,以及应对多种自然灾害、事故和恐怖破坏等公共卫生突发事件医学应急处理培训的重要教材。

据了解,"中华优秀出版物奖"是与"五个一工程奖"、"中国出版政府奖"并列的全国出版界三大奖之一,每两年评选一次。本届评奖活动启动于 2008 年 4 月,将 2006 年以来在全国 20 多万种图书中精选的、最后确定的 385 家出版社选送的 668 种图书进行参评,通过初评、复评、投票定评,最终产生获奖作品。第二届"中华优秀出版物奖"分设图书奖、论文奖、音像奖、电子奖、游戏奖五大奖项和抗震救灾特别奖项。本届"中华优秀出版物奖"图书类最终评出 50 种正式奖、80 种提名奖,在正式奖中仅有 5 种医学类图书获奖。

(冉新泽 供稿)