文章编号:1000-5404(2009)13-1275-03

论著

核酸外切酶-压电石英DNA传感器检测金黄色葡萄球菌的实验研究

黄君富,夏 涵,黄 庆,府伟灵 (第三军医大学西南医院检验科,重庆 400038)

摘 要:目的 构建一种用于检测金黄色葡萄球菌的核酸外切酶-压电石英DNA传感器新方法,同时对其重要影响因素进行探讨。**方法** 采用λ核酸外切酶处理金黄色葡萄球菌PCR产物,EB染色、电泳后于紫外灯下进行观察,对杂交温度、杂交时间和杂交响应性能等因素进行实验研究,进一步将构建的核酸外切酶-压电石英DNA传感器法用于金黄色葡萄球菌检测,并对其灵敏度和特异性进行研究。**结果** λ核酸外切酶-压电石英DNA传感器法最适杂交温度为35℃,最适杂交时间为60 min,响应性能显著大于普通压电DNA传感器($P<0.01$),可以检测到1.0×10^4 CFU/ml的金黄色葡萄球菌,特异性好。**结论** 利用核酸外切酶-压电石英DNA传感器检测金黄色葡萄球菌,具有杂交效率高、技术难度低、频率响应性能高等优点,有较好的应用前景。

关键词: 石英晶体微天平;生物传感器;λ核酸外切酶;金黄色葡萄球菌
中图法分类号: R312; R378.11; R446.5 **文献标识码:** A

Detection of *Staphylococcus aureus* by a lambda exonuclease based piezoelectric quartz crystal microbalance DNA sensor

HUANG Jun-fu, XIA Han, HUANG Qing, FU Wei-ling (Department of Laboratory Medicine, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To develop a new type of piezoelectric quartz crystal microbalance DNA sensor based on lambda exonuclease to detect *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and optimize the main detection conditions. **Methods** After the DNA was extracted from the stain of *S. aureus* and the target fragment was amplified with self-designed universal primers, the PCR products were treated with Lambda exonuclease and visualized by agarose gel electrophoresis with ethidium bromide followed by a gel documentation system analysis. Then the products with or without exonuclease digestion were added into our piezoelectric quartz crystal microbalance DNA sensor for hybridization. The temperature and time of hybridization were optimized respectively. The specificity and sensitivity of our detection system were evaluated. **Results** The optimal temperature for hybridization was 35℃ and the optimal time was 60 min. The sensitivity of the lambda exonuclease based DNA sensor was better than that of common DNA sensor. The lowest detection limit of this new type quartz crystal microbalance system was 1.0×10^4 CFU/ml. **Conclusion** The lambda exonuclease based quartz crystal microbalance system we designed has the advantages of high efficiency in hybridization, easy to operate, and good response performance. Thus it can be applied to detect *S. aureus* infections.

Key words: quartz crystal microbalance; biosensor; lambda exonuclease; Staphylococcus aureus

金黄色葡萄球菌是人类感染性疾病的重要病原菌,毒力强,除引起局部炎症外,还可以引起多种系统的化脓性疾患以及菌血症、心内膜炎等危及生命的疾病[1]。近年来,生物传感器由于其操作简便、检测准确、价格低廉等特点,已经在医药卫生、环境监测等领域取得了突飞猛进的发展[2-4]。随着声光技术、微电子技术的迅速发展,一种基于石英晶体的压电现象发展而来的压电石英DNA传感器逐渐发展成熟起来,它是以压电石英晶体为换能器、以特异性短核酸探针为分子识别元件的一种新型DNA传感器,其集合了核酸探针杂交技术的高特异性和石英晶振微天平的高灵敏性。本研究基于我们前期构建的压电石英DNA传感器检测系统[5],利用λ核酸外切酶专一降解双链DNA

基金项目:国家高技术研究发展计划(863计划)(2007AA022005);国家自然科学基金(30672004,30571775)
Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program, 2007AA022005) and the National Natural Science Foundation of China (30672004, 30571775)
作者简介:黄君富,男,四川省南充市人,硕士研究生,副主任技师,主要从事实验诊断学方面的研究。电话:(023)68754430, E-mail: junfu_huang@yahoo.com
通信作者:府伟灵,E-mail: weilingfu@yahoo.com
收稿日期:2009-03-20;修回日期:2009-04-01

中5′磷酸标记链,从而使非标记的单链释放出来,提高压电石英DNA传感器的杂交效率,同时对该传感器的探针固定量、杂交效率、反应最适温度等进行了研究,旨在建立一种基于核酸外切酶-压电石英DNA传感器的金黄色葡萄球菌快速检测方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 石英谐振式压电DNA传感器阵列检测系统 由本室与中国电子科技集团公司第二十六研究所、中国嘉陵集团亿基科技发展有限公司合作研制。系统由自激式振荡电路、频率记录分析软件、2×5型金属螺旋式传感器阵列、温控系统、信息缓冲器、计算机等部件组成。

1.1.2 主要试剂 6-巯基己醇购自美国Sigma-Aldrich公司,dNTP(2.5 mmol/L)、10×PCR缓冲液、$MgCl_2$(25 mmol/L)和*Taq*酶(5 U/μl),购自promege公司,λ核酸外切酶购自美国Fermentas公司,高效液相杂交液购自北京博大泰克生物基因技术有限责任公司。PBS缓冲液10 μmol/L,pH = 8.0;Piranha溶液(浓H_2SO_4:H_2O_2 = 3∶1);1.0 mol/L HCl;5% Chelex-100裂解缓冲液均为本实验室自行配制。所用其他试剂均为AR级。

1.1.3 菌株来源 金黄色葡萄球菌菌株(ATCC 25923),铜绿假单胞菌菌株(ATCC 27853),大肠埃希菌菌株(ATCC 25922)由本科微生物室提供。

1.1.4 引物和探针设计 自行设计病原菌的通用引物16s-s:5′-TGGCGGCGTGCCTAATACATG、16s-a:5′-CCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTC,巯基修饰的探针P-sa:5′-CTTCTCTGATGTTAGCGGCG和阴性对照NC:5′-CTTCTCTGATGTTAGCGGCG由上海英骏生物技术公司合成,16s-s的5′端采用磷酸标记,用于后续分析中λ核酸外切酶的识别及作用,扩增片段大小为320 bp。

1.2 实验方法

1.2.1 探针的固定 以巯基自组装的方法将2.0 μmol/L的探针固定在传感器阵列金膜表面,加入6-巯基己醇封闭。步骤参见文献[5]进行。

1.2.2 菌株DNA的提取和PCR扩增 将平板培养的菌株配制成浓度为1.0×10^8CFU/ml的菌液,采用改良chelex100法提取细菌基因组DNA[6]。引物各1 μl,dNTP 1 μl,10×PCR缓冲液2.5 μl,$MgCl_2$ 3 μl,Taq酶1 μl,模板2 μl,加无菌去离子水至25 μl,于微量离心管中在PCR仪上按下列参数扩增:94 ℃预处理5 min,94 ℃ 30 s→58 ℃ 45 s→72 ℃ 45 s(30个循环),经72 ℃延伸5 min。

1.2.3 λ核酸外切酶降解PCR产物正义链 50 μl反应体系中包括:λ核酸外切酶10 U,10× buffer 5 μl,PCR产物45 μl。将上述体系置于37 ℃温浴30 min,处理完毕后,80 ℃反应10 min灭活λ核酸外切酶。

1.2.4 琼脂糖凝胶电泳 分别取PCR扩增产物和酶降解产物5 μl,用1.5 %琼脂糖凝胶电泳,以TaKaRa DNA Marker DL 2000作分子量标准,空白对照作为阴性对照,溴化乙锭染色,紫外灯下观察。

1.2.5 PCR产物的测定 分别调节检测仪温度至30 ℃、35 ℃、40 ℃、45 ℃、50 ℃,检测池中加入高效液相杂交液90 μl,观察频率至稳定。未经酶降解处理的PCR产物99 ℃变性5 min,迅速冰浴1 min,即刻加入10 μl于传感器中进行杂交反应,观察频率变化;经酶降解处理的PCR产物,加入10 μl于传感器中进行杂交反应,观察频率变化,以2.0 μmol/L的NC作为阴性对照,实验重复5次以取平均值。

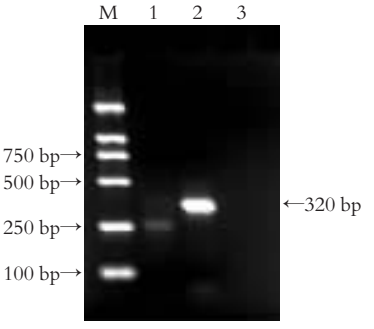
1.3 统计学分析

采用SPSS 13.0分析软件进行*t*检验。

2 结果

2.1 λ核酸外切酶处理PCR产物电泳结果

琼脂糖凝胶电泳显示,经过λ核酸外切酶处理后,PCR扩增产物中的5′端磷酸标记的正义链被降解,产物呈现单链形式,条带泳动位置较未经处理的双链PCR产物靠前,见图1。

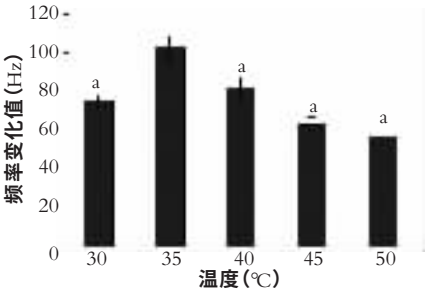


M:标准(DL 2000);1:λ核酸外切酶降解PCR产物;2:PCR产物;3:空白对照

图1 λ核酸外切酶降解PCR产物电泳结果

2.2 杂交温度对杂交时响应频率的影响

选取30 ℃、35 ℃、40 ℃、45 ℃、50 ℃为杂交温度,采用探针P-sa(2.0 μmol/L)在石英晶振上固定后进行杂交。结果表明,当杂交温度为35 ℃时,探针与降解产物中靶序列进行杂交所引起的频率变化值高于杂交温度为30 ℃、40 ℃、45 ℃、50 ℃时的频率变化值($P<0.05$),结果见图2。我们选择35 ℃为后续压电石英DNA传感器检测时的杂交温度。



a:$P<0.05$,与35 ℃比较

图2 杂交温度对杂交频率变化的影响

2.3 核酸外切酶法处理对杂交效率的影响

热变性处理PCR产物杂交时,杂交响应频率至90 min时频率下降为(85±3.5)Hz,随后至120 min,杂交响应频率增加不明显。λ核酸外切酶处理PCR产物杂交时,杂交响应频率随时间的增加而显著增加,至60 min时频率下降为(103±5.2)Hz,随后至120 min,杂交响应频率增加不明显。热变性处理PCR产物和λ核酸外切酶处理PCR产物杂交时频率改变与时间的比值(Hz/min)分别为0.71和1.72,两者间有明显差异

($P<0.01$)。

2.4　核酸外切酶-压电石英 DNA 传感器法检测金黄色葡萄球菌的特异性及灵敏度

将设计的金黄色葡萄球菌探针固定于石英晶振表面,检测池中分别加入 3 种病原菌(1.0×10^7)CFU/ml 核酸外切酶处理产物,以验证核酸外切酶-压电石英 DNA 传感器法检测金黄色葡萄球菌的特异性,结果显示,检测金黄色葡萄球菌核酸外切酶处理产物时引起的频率变化值(103 ± 5.2)Hz 与检测铜绿假单胞菌(10 ± 1.5)Hz、大肠埃希菌(12 ± 2.1)Hz 所引起的频率变化值有明显差异($P<0.01$),与此相对照的阴性对照序列杂交引起的频率变化不明显(<10 Hz)。我们将阴性对照($\bar{x}\pm3s$)作为特异性响应信号的判断下限,即 >20 Hz 为特异性响应信号,结果表明,随着菌液浓度的降低,传感器响应频率变化随之减少,当菌液浓度低于 1.0×10^4 CFU/ml 时,传感器频率变化值小于 20 Hz,无法检出目标菌,因而核酸外切酶-压电石英 DNA 传感器法检测金黄色葡萄球菌的灵敏度为 1.0×10^4 CFU/ml。

3　讨论

压电石英传感器技术应用了压电晶体的"逆压电效应",当交变激励电压施加于压电晶体两侧的电极时,晶体会产生机械变形振荡,当交变电压频率与晶体固有频率相同时,振幅加大,形成压电谐振,此特定频率称为谐振频率,谐振频率与晶体的物理尺寸和性质密切相关。压电石英 DNA 传感器就是基于压电石英晶体表面固定寡核苷酸与靶核苷酸杂交后会引起晶体振荡频率的变化原理,根据杂交前后晶体振荡频率的变化测定靶核苷酸[7,8]。我们在前期构建的压电石英 DNA 传感器检测系统的基础上[5],利用 λ 核酸外切酶的特性,以期进一步提高传感器杂交效率,使检测系统更加实用化。

λ 核酸外切酶可以催化双链 DNA 分子自 5′-P 末端进行逐步的加工和水解,释放出 5′单核苷酸,但它不能降解 5′-OH 末端。根据 λ 核酸外切酶的功能特点,我们将正向引物 5′端磷酸化,于靶序列 PCR 扩增完成后,进行酶切处理,将正义链降解,保留与探针互补的反义链。电泳结果显示,λ 核酸外切酶有效的降解了金黄色葡萄球菌 PCR 扩增产物中的正义链,与 PCR 产物电泳条带比较,酶处理产物条带靠前,说明该产物为单链形式。

杂交温度主要影响实验敏感性,由实验结果看出杂交温度为 35℃时,传感器杂交频率变化值与其他杂交温度下的频率变化值相比,具有显著优势($P<0.05$),因此我们选择此杂交温度 35℃为最适温度。这一结果与前期研究中热变性 PCR 产物最适杂交温度为 40 ℃[9] 相比,有所降低,分析其原因是因为单链形式 DNA 与探针结合较热变性双链 DNA 与探针结合所需能量低,因而可以在较低温度下进行杂交,同时也避免了较高反应温度对传感器晶振频率的影响[10]。杂交时间是影响杂交效率的重要因素。实验结果表明,酶切处理 PCR 产物与热变性 PCR 产物相比,杂交时间更短,同时杂交所引起的频率改变更大。热变性处理 PCR 产物和 λ 核酸外切酶处理 PCR 产物杂交时频率改变与时间的比值(Hz/min)有明显差异($P<0.01$),提示 λ 核酸外切酶处理提高了杂交效率。分析其原因,可能是 λ 核酸外切酶处理 PCR 产物呈单链形式,并且不存在互补链,因此可以消除由 PCR 产物的两条链重退火形成无效杂交体的影响。此外,核酸外切酶-压电石英 DNA 传感器法可以检测到 1.0×10^4 CFU/ml 的金黄色葡萄球菌,检测特异性较好,非特异结合响应频率低。

本研究将 λ 核酸外切酶引入压电石英 DNA 传感器,建立了一种新的金黄色葡萄球菌检测方法,与普通压电石英 DNA 传感器检测方法相比,具有杂交效率高、频率响应性能高等优点,具有较好的应用前景。

参考文献:

[1] Kurt K, Alderborn A, Nilsson M, *et al*. Multiplexed genotyping of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates by use of padlock probes and tag microarrays [J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(3): 577 – 585.

[2] 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.

[3] Mao X, Yang L, Su X L, *et al*. A nanoparticle amplification based quartz crystal microbalance DNA sensor for detection of Escherichia coli O157:H7 [J]. Biosens Bioelectron, 2006,21(7):1178 – 1185.

[4] Yang A Y, Rawle R J, Selassie C R, *et al*. A quartz crystal microbalance study of polycation-supported single and double stranded DNA surfaces[J]. Biomacromolecules, 2008, 9(12): 3416 – 3421.

[5] 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.

[6] 夏　涵,府伟灵,陈　鸣,等. 快速提取细菌 DNA 方法的研究[J]. 现代预防医学,2005,32(5): 571 – 573.

[7] Lazcka O, Del-Campo F J, Munoz F X. Pathogen detection: a perspective of traditional methods and biosensors [J]. Biosens Bioelectron, 2007, 22(7): 1205 – 1217.

[8] Chen M, Liu M, Yu L, *et al*. Construction of a novel peptide nucleic acid piezoelectric gene sensor microarray detection system [J]. J Nanosci Nanotechnol, 2005, 5(8): 1266 – 1272.

[9] Xia H, Wang F, Huang Q, *et al*. Detection of Staphylococcus epidermidis by a quartz crystal microbalance nucleic acid biosensor array using au nanoparticle signal amplification [J]. Sensors-Basel, 2008, 8(10): 6453 – 6470.

[10] Hahn S, Mergenthaler S, Zimmermann B, *et al*. Nucleic acid based biosensors: the desires of the user [J]. Bioelectrochemistry, 2005,67(2):151 – 154.

(编辑　栾　嘉)