论著

文章编号:1000-5404(2010)03-0210-04

基于"单碱基延伸和酶放大系统"的SNP漏声表面波生物传感器的实验研究

唱 凯,陈 伟,张 泉,徐泽刚,靳晓军,张可珺,王云霞,王 丰,陈 鸣 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所检验科)

[摘要] **目的** 探讨漏声表面波生物传感器检测单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)的方法。**方法** 分别在漏声表面波生物传感器反应体系加入2条仅存在一个碱基不同(A/G)的靶序列,与固定的探针杂交。利用酶生物信号放大系统,结合单碱基延伸技术,观察其杂交信号的改变。**结果** 靶位点为完全匹配的A时,相位下降(6.47°±0.42°);而靶位点为错配的G时,相位下降仅为(0.77°±0.25°),两者差异有统计学意义($P<0.01$)。**结论** 成功建立了漏声表面波生物传感器检测SNP的新方法。

[关键词] 漏声表面波生物传感器;信号放大;SNP

[中图法分类号] R318.04; R197.39; R394-33 **[文献标志码]** A

Single base extension and enzyme amplification system based single nucleotide polymorphism leaky surface acoustic wave biosensor

Chang Kai, Chen Wei, Zhang Quan, Xu Zegang, Ji Xiaojun, Zhang Kejun, Wang Yunxia, Wang Feng, Chen Ming (Department of Clinical Laboratory Medicine, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[Abstract] **Objective** To study how to use the leaky surface acoustic wave (LSAW) biosensor to detect single nucleotide polymorphism (SNP). **Methods** Two target sequences with a base difference (A/G) were added onto the LSAW biosensor reaction system and hybridized with corresponding probes. The enzyme signal amplification system was used in combination with single base extension (SBE) technology to observe changes in hybridization signals. **Results** The corresponding phase of targets was decreased to 6.47°±0.42° and 0.77°±0.25°, respectively, when the target point completely matched A and mismatched G ($P<0.01$). **Conclusion** A new method for the detection of SNP with a LSAW biosensor has been successfully established.

[Key words] leaky surface acoustic wave biosensor; signal amplification; single nucleotide polymorphism

Supported by the National High Technology Research Development Program of China (863 Program, 2007AA02Z416), the National Natural Seience Foundation of China (30400107) and the Tackling Project of "Eleventh Five-year Plan" of Medical Science and Technology of PLA (06G073). Corresponding author: Chen Ming, Tel: 86-23-68757602, E-mail: chenming1971@yahoo.cn

单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)作为基因变异的主要形式,以其数量多、分布广和稳定遗传等特点,在生物医学、遗传学、基因突变与疾病易感基因筛查、药物敏感性研究以及人群进化史研究和作物品种鉴定等方面中发挥着重要的作用[1-3]。但由于缺乏简单有效快速低廉的临床检测手段,SNP的研究还停留在实验室阶段。

生物传感器[4]是将生物活性材料(酶、蛋白质、DNA、抗体、抗原、生物膜等)与物理化学换能器有机结合从而实现定性、定量测量的一种分析仪器。而漏声表面波生物传感器(leaky surface acoustic wave biosensor, LASW)是近年来生物传感器研究的热点之一,其具有简单实用快速低廉的特点,如能将其应用于SNP的检测将具有广阔的潜在临床应用前景。本研究将"单碱基延伸和酶放大系统"引入漏声表面波生物传感器,从而提高传感器阵列检测信号的灵敏度,并在此基础上建立一种新型的SNP检测方法。

1 材料与方法

1.1 主要仪器及设备

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研究所共同设计制作。传感器采用双通道双

[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);全军医学科研"十一五"计划科技攻关项目(06G073)

[通信作者] 陈 鸣,电话:(023)68757602,E-mail:chenming1971@yahoo.cn

端对谐振型结构设计,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,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,而参比通道是为了减低非特异性物质的吸附。$LiTaO_3$ 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 $LiTaO_3$ 晶体之间是钛膜。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　网络分析仪　　日本 ADVANTEST 公司生产的 R3767CG 型多功能分析仪。

1.1.3　相位记录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 26 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。

1.2　主要试剂

探针序列由上海生工生物公司合成修饰:Probe-1:5′-SH-$(CH_2)_6$-CATGCACAAAAATGCCAACTT-3′;Probe-2:5′-SH-$(CH_2)_6$-CATGCACAAAAATGCCAACTT-biotin-3′。

碱基变异的靶序列以流行性乙型脑炎减毒活疫苗株 SA-14-14-2 基因组为模板,由上海生工生物公司合成修饰:Target-A:5′-GAAAACATCAAATACAAAGTTGGCATTTTTGTGCATG-3′;Target-G:5′-GAAAACATCAAATACGAAGTTGGCATTTTTGTGCATG-3′。

HRP 标记链亲和素 Lot FH170613 购自晶美生物公司。biotin-11-dUTP(1 mmol/L)购自南京凯基生物公司。浓缩型 DAB 试剂盒购自北京中杉公司。DNA 聚合酶:Pfu 酶,2.5 U/μl,购自北京天根生物有限公司。所用缓冲液:PBS(pH 8.0,0.17 mol/L);SSC(2×,pH 7.5);Piranha 溶液(30% H_2O_2 与 98% H_2SO_4 按 1∶3 混合)。常规试剂均为分析纯级,自行配制。牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)由罗氏公司生产。

1.3　实验方法

1.3.1　$LiTaO_3$ 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,超纯水反复清洗,氮气吹干备用。

1.3.2　LSAW 生物传感器气相平衡　　将制备好的 LSAW 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。

1.3.3　酶生物信号放大系统的模式实验　　分别在检测和参比两通道分别固定终浓度为 1.0 μmol/L 的 Probe-1、Probe-2,后用 0.1 mg/ml BSA 封闭金膜表面未结合的活性位点。在检测和参比两通道分别加入 35μl streptavidin-HRP 工作液及 DAB 底物液 5 μl,观察相位变化值。重复 3 次以上后取平均值。

1.3.4　SNP-LSAW 基因传感器检测方法的实验　　分别在检测和参比两通道分别固定终浓度为 1.0 μmol/L 的 Probe-1,后用 0.1 mg/ml BSA 封闭金膜表面未结合的活性位点。在检测和参比两通道分别加入终浓度为 1.0 μmol/L 的 Target-A、Target-G 进行杂交反应,经 SBE 体系 37 ℃孵育 1 h 后加入 streptavidin-HRP 工作液 5 μl 及 DAB 底物液 5 μl,观察相位的变化。重复 3 次以上取平均值。

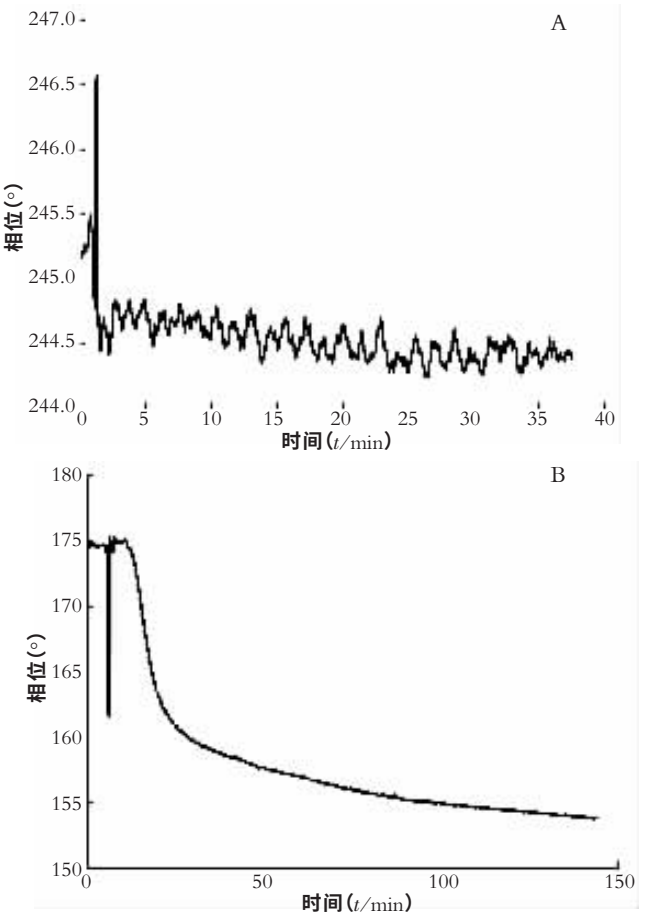
1.4　统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件进行 t 检验。

2　结果

2.1　酶生物信号放大系统的模式实验结果

通过对 Probe-1 和 Probe-2 分别进行酶生物信号放大,观察 LASW 基因传感器的相位变化。固定 Probe-1 的检测孔固定 60 min 时,相位变化值为(2.13° ±0.40°),进行酶信号放大后,相位变化值为(0.47° ±0.58°);而固定 Probe-2 的检测孔固定 60 min 时,相位变化值为(1.80° ±0.20°),进行酶信号放大后,相位变化值为(20.33° ±1.53°),2 种探针进行酶放大后相位变化值有明显差异($P<0.01$)。LASW 生物传感器对 Probe-1 和 Probe-2 分别进行酶生物信号放大的相位变化趋势见图 1。结果表明酶生物信号放大系统对检测结果有显著放大。

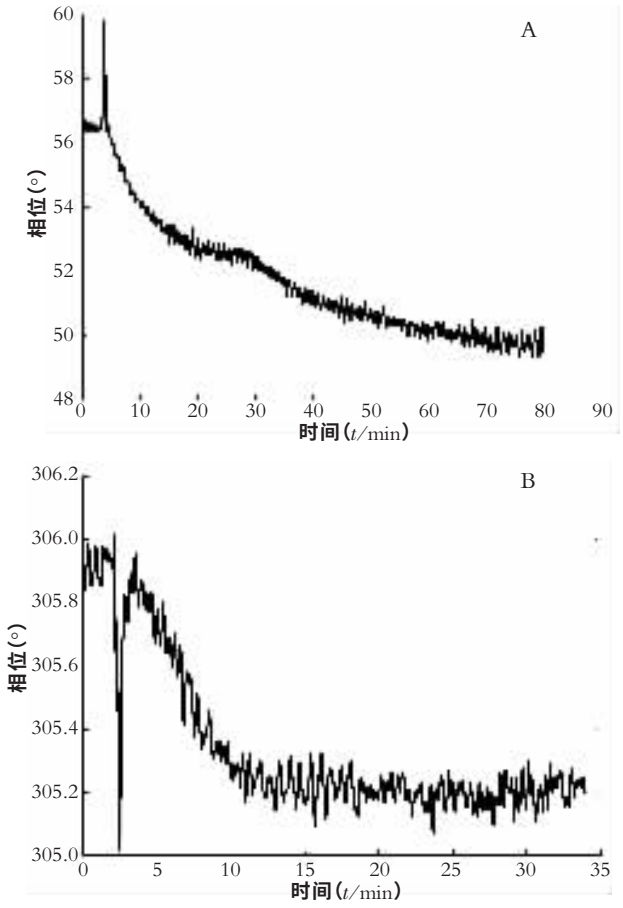


A:Probe1 酶放大后;B:Probe2 酶放大后

图 1　信号放大前后 LASW 基因传感器相位变化趋势

2.2　SNP-LSAW 基因传感器检测方法的实验结果

通过 LASW 生物传感器观察不同靶序列的相位变化,结果表明,待测靶序列为 Target-A 时,相位迅速下降(6.47° ±0.42°);而待测靶序列为 Target-G 时,相位下降(0.77° ±0.25°),2 种靶序列相位变化值差异有统计学意义($P<0.01$)。LASW 生物传感器对 Target-A 和 Target-B 分别进行检测随时间变化趋势相位变化见图 2,结果表明 SNP-LSAW 基因传感器对 Target-A 和 Target-B 的检测存在显著差异。



A:Target-A 反应相位变化趋势图;B:Target-G 反应相位变化趋势图

图2 不同靶序列 SNP-LSAW 基因传感器相位随时间变化趋势

3 讨论

生物传感器技术被列为迈向21世纪五大医学检验技术之一,而LSAW传感器是近年来逐渐发展起来的新型生物传感器[5-7],它是将LSAW传播路径表面发生特异性生物反应的质量变化转化为输出电信号的频率或相位改变,从而可以极为敏感的对生物反应进行定性或定量分析的一种新的检测方法。做为新型质量型传感器的一种,它综合了物理、材料、微电子、信号处理、工艺等众多学科的知识。LSAW传感器以其高灵敏度、重复性及可靠性好等优点在生物学检测上具有重要意义。本研究中创新地将延迟线型LSAW传感器改进为双通道双端对谐振型传感器,即在LSAW传感器两个单相单向叉指换能器结构的外围加入了反射栅阵列,增加信号行程,从而提高检测的灵敏度。

目前关于生物传感器用于单核苷酸多态性检测的研究报道很多[8-12]。但是由于非特异性杂交,存在分辨率不高等缺点。而对于病原微生物的基因检测来说,由于所检测DNA质量微小,导致生物传感器的信号变化值也较小,因此信号放大系统对提高生物传感器检测生物反应微小信号的灵敏度具有重要意义[13]。本研究中采用前期研究的HRP-DAB生物信号放大系统[14],并引入单碱基延伸(SBE)技术[15],即设计带有双重功能的SBE引物序列,该引物3′端为目的基因的互补序列,退火后在链3′端即SNP位点处延伸上带有生物素标记的单个碱基,5′端为与探针互补的标签序列,在探针3′端进行固相单碱基延伸反应。通过单碱基延伸和生物酶放大将单个碱基变化引起的微弱变化有效、特异地放大[16,17]。

本研究通过生物素标记的Probe-2和Probe-1的差异进行了生物酶放大系统的构建,实验结果表明Probe-2和Probe-1相位变化存在明显差异。对于待测靶序列的检测,本研究中结合单碱基延伸方法,由于target-A和target-G单个碱基的差异,导致与探针杂交的匹配程度及单碱基延伸反应发生与否,从而检测到碱基变异位点信息。实验结果表明,检测target-A时,相位下降(6.47°±0.42°);而待测靶序列为target-G时,相位下降(0.77°±0.25°),两者结果差异有统计学意义($P<0.01$)。表明该方法是可行的,并具有良好的分辨率。

综上所述,我们将单碱基延伸和生物酶放大系统有机结合应用于SNP-LSAW基因传感器,该检测方法与目前多种SNP检测方法相比具有快速、无需标记、实时动态准确显示等优点。且较传统的生物传感器成本低廉、操作简单。这必将为临床SNP提供了一个经济、实用的新检测方法。

参考文献:

[1] Liu G D, Lee T M H, Wang J. Nanocrystal-based bioelectronic coding of single nucleotide polymorphisms[J]. J Am Chem Soc, 2005, 127(1): 38-39.

[2] Redon R, Ishikawa S, Fitch K R, *et al*. Global variation in copy number in the human genome [J]. Nature, 2006, 444(7118): 444-454.

[3] Bakker S C, Hoogendoorn M L, Hendriks J, *et al*. The PIP5K2A and RGS4 genes are differentially associated with deficit and non-deficit schizophrenia [J]. Genes Brain Behav, 2007, 6(2): 113-119.

[4] 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.

[5] Nakamura H, Karube I. Current research activity in biosensors[J]. Anal Bioanal Chem, 2003, 377(3): 446-468.

[6] Makkonen T, Plessky V P, Steichen W, *et al*. Longitudinal leaky SAW resonators and filters on YZ-$LiNbO_3$[J]. IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control, 2006, 53(2): 393-401.

[7] 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.

[8] Akagi Y, Makimura M, Yokoyama Y, *et al*. Development of a ligation-

based impedimetric DNA sensor for single-nucleotide polymorphism associated with metabolic syndrome[J]. Electrochimica Acta, 2006, 51(28): 6367 – 6372.
[9] Feng K, Li J, Jiang J, *et al*. QCM detection of DNA targets with single-base mutation based on DNA ligase reaction and biocatalyzed deposition amplification[J]. Biosens Bioelectron, 2007, 22(8): 1651 – 1657.
[10] 徐清华,陈鸣,陈伟,等. 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[J]。第三军医大学学报,2009, 31(9): 765 – 767.
[11] Zhang P, Chu X, Xu X, *et al*. Electrochemical detection of point mutation based on surface ligation reaction and biometallization[J]. Biosens Bioelectron, 2008, 23(10): 1435 – 1441.
[12] Mao X, Jiang J, Xu X, *et al*. Enzymatic amplification detection of DNA based on "molecular beacon" biosensors[J]. Biosens Bioelectron, 2008, 23(10): 1555 – 1561.
[13] 王云霞,张立群,罗阳,等. 漏声表面波传感器生物信号放大系统的研究[J]. 第三军医大学学报,2009, 31(11): 1013 – 1016.
[14] 王丰, 府伟灵, 夏涵, 等. 应用"酶生物信号放大系统"放大 DNA 压电传感器检测信号的研究[J]. 重庆医学, 2007, 36(7): 599 – 600, 603.
[15] Patolsky F, Lichtenstein A, Willner I. Detection of single-base DNA mutations by enzyme-amplified electronic transduction [J]. Nat Biotechnol, 2001, 19(3): 253 – 257.
[16] Di-Giusto D, King G C. Single base extension (SBE) with proofreading polymerases and phosphorothioate primers: improved fidelity in single-substrate assays [J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31 (3): e7.
[17] 王丰, 夏涵, 陈鸣, 等. 应用压电生物传感器检测 HBV 感染相关 SNP 位点的实验研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2008, 18(3): 305 – 308, 352.

(**收稿**:2009-07-17;**修回**:2009-09-10)
(编辑 张 维)

文章编号:1000-5404(2010)03-0213-01

个案与短篇

妊娠合并肝血管瘤破裂出血 1 例

曾 毅,王 琳 (400038 重庆,第三军医大学西南医院妇产科)

[关键词] 妊娠;肝血管瘤破裂;肝癌;诊断;治疗
[中图法分类号] R714.25 **[文献标志码]** B

妊娠合并肝脏的包块的病因众多,其中血管瘤是最常见的肝脏良性肿瘤,精确发病率很难界定,很多人无症状或者将症状误以为是妊娠引起,妊娠增加肝血管瘤并发症的发生率,却限制了诊断和干预的方式,极易造成误诊或漏诊,出现不良结局[1]。我科于 2009 年 2 月收治 1 例妊娠合并肝血管瘤破裂的患者,现报告如下。

1 临床资料

孕妇 23 岁,孕 2 产 0,因"孕 6 月余,左上腹不适 20 d"于 2009 年 2 月 10 日入本院肝胆外科,入院前 20 d ,患者进食油腻食物后突发左上腹及中上腹不适,咳嗽、活动时明显,伴肩背部放射及恶心呕吐。在外院查血尿淀粉酶正常,腹部超声及 CT 均发现肝左叶占位性病变;AFP:216.5 ng/ml。查体:皮肤巩膜无黄染,无肝掌蜘蛛痣。腹壁静脉无曲张,下腹部膨隆,腹软,全腹无压痛反跳痛及肌紧张,剑突下可扪及一约 4 cm × 5 cm大小质硬包块,表面光滑,界清,轻压痛,未闻及血管杂音。入院检查:上腹部增强 CT:①左肝血肿?(前方病灶);②左肝血管性病变或者富血供肿瘤合并血肿形成;③腹膜后淋巴结无肿大。肿瘤标志物:CA125 103.2 kU/L, CA19-9 232.1 kU/L, CA242 > 200 kU/L , AFP 134.5 ng/ml;血常规示中度贫血;肝功、肾功、电解质、PT、APTT、OGTT 等基本正常。乙肝两对半阴性;初步诊断:原发性肝癌伴包膜下出血,并因孕 6 余月要求引产转至产科,给予阴道后穹窿上米索前列醇及宫颈扩张棒引产,于 2009 年 2 月 14 日行臀牵引术产出一死婴。于 2 月 16 日转回肝胆科,2009 年 3 月 4 日在全麻下行左肝外叶切除术,术中见腹腔内无腹水及积血,肝脏色红润,质地软,无纤维化,左肝外叶与膈肌有少许炎性粘连,分离后见左肝外叶膈面一约 8 cm × 5 cm 大小略突出于肝表面呈囊性包块,边界清楚。肝左外下叶脏面可见一约 6 cm × 5 cm 大小类圆形包块,质硬,边界尚清。探查胆囊未见异常,肝十二指肠韧带内无肿大淋巴结。术后标本剖视见囊性包块为一包裹性陈旧性血肿,其下方为肿瘤,瘤内有陈旧性出血。病理结果示:(左肝外叶)血管瘤伴出血、坏死。术后白细胞及转氨酶轻度升高后逐渐恢复至正常,治愈出院。

2 讨论

妊娠合并肝脏包块的病因众多,其中血管瘤是最常见的肝脏良性肿瘤。妊娠期合并肝血管瘤破裂极少见,易与肝癌混淆。妊娠期肝血管瘤及肝癌均有长大的趋势,正常妊娠妇女的甲胎蛋白(AFP)也可高于正常,使两病难以鉴别。在孕期分泌大量性激素的刺激下以及增大的子宫的压迫的作用下,两者均可以发生破裂出血,更易导致诊断困难[1,2]。本例患者有疼痛及消化道症状,查体剑突下可扪及一约 4 cm × 5 cm 大小质硬包块,部分肿瘤标志物升高,故术前临床拟诊为妊娠合并肝癌破裂,但患者无乙肝病史,AFP < 400 ng/ml, CT 提示左肝占位为血管性病变,而肝癌患者的症状较重,除了肝区疼痛、消化道症状外,常有乏力、消瘦、发热,可合并转移灶的症状和伴癌综合征。肝血管瘤与肝恶性肿瘤的治疗和预后有本质的区别,因此正确的诊断极其重要。大部分妊娠合并肝血管瘤可观察随访,若为妊娠合并肝血管瘤破裂,可行手术治疗切除部分肝组

(下转 219 页)

[通信作者] 王 琳,电话:(023)68765399,E-mail:drwangl@yahoo.com.cn