论著

文章编号:1000-5404(2010)04-0346-03

纳米金颗粒质量放大压电 DNA 传感器频移信号的研究

蔡 晋[1],王 珏[1],夏 季[2],罗 阳[1],黄君富[1],张晓莉[1],府伟灵[1] (400038 重庆,第三军医大学西南医院检验科[1];400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所检验科[2])

[摘要] **目的** 探讨纳米金颗粒质量放大压电 DNA 传感器频移信号的可行性,以进一步提高检测灵敏度。**方法** 将巯基化的单链 DNA 探针固定于压电 DNA 传感器石英晶体金膜表面,封闭后加入合成的生物素化的互补靶 DNA 与之进行杂交反应,最后用 5 nm 粒径的链亲和素标记的胶体金追加标记于杂交后的生物素化的靶 DNA 上,以增加石英晶振金膜表面的质量负载,从而降低石英晶振的响应频率,进一步放大频移信号。**结果** 检测终浓度为 10^{-8} mol/L 的阳性靶序列时杂交反应前后频移为(12.7±5.5) Hz,加入终浓度为 9% 的纳米金颗粒放大后总频移为(126±2.6) Hz,后者显著高于前者($P<0.01$)。另外,对不同终浓度的阳性靶序列检测后发现,频移与其终浓度的 lg 值之间具有显著的线性关系,相关系数为 0.974,而且最低检出限达到了 10^{-12} mol/L。**结论** 实验结果表明该方法可以显著放大压电 DNA 传感器的频移信号,从而进一步提高压电 DNA 传感器检测的灵敏度。

[关键词] 纳米技术;生物传感技术;放大;频移

[中图法分类号] R319;R446;R394-33 [文献标志码] A

Frequency shift signals of gold nanoparticles in mass amplified piezoelectric DNA sensor

Cai Jin[1], Wang Jue[1], Xia Ji[2], Luo Yang[1], Huang Junfu[1], Zhang Xiaoli[1], Fu Weiling[1] ([1]Clinical Laboratory Medicine, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Department of, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the DNA frequency shift signals of gold nanoparticles in mass amplified in piezoelectric DNA sensor. **Methods** The biotinylated target DNA after hybridation was labeled with 5 nm gold nanoparticles and colloidal gold to increase the mass load on the surface of quartz crystals by decreasing the response frequency of quartz crystals and further amplifying the frequency shift signals. **Results** The frequency shift signals of gold nanoparticles in the piezoelectric DNA sensor could be significantly amplified ($P<0.01$) and the lowest rate of synthesized oligonucleotides detected with the sensor was 10^{-12} mol/L. **Conclusion** The sensitivity of piezoelectric DNA sensor can be further improved by mass amplification.

[**Key words**] nanotechnology; amplification; biosensing techniques; frequency shift

Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program, 2007AA022005) and the Scientific Research Foundation for Medical Science and Public Health of PLA (06G073); Corresponding author: Fu Weiling, Tel: 86-23-68754429, E-mail: weilingfu@yahoo.com

压电 DNA 传感器是近年发展起来的一种新的基因检测手段,与常规的核酸检测方法相比,压电 DNA 传感器具有液相杂交、实时检测、灵敏度高、特异性强、成本低、无污染、便于携带等特点而备受人们青睐。纳米技术与生物传感技术相结合是 DNA 传感器发展的一大趋势。纳米金颗粒具有很好的生物相容性,易与 DNA 分子结合。此外,由于纳米金颗粒的质量远远大于 DNA 分子的质量,纳米金颗粒通过标记与 DNA 杂交体系结合后,即可增加石英晶振金膜表面的质量负载,从而降低响应频率,放大频移信号,提高传感器的检测灵敏度[1]。本研究以纳米金颗粒为 DNA 标记物,以探讨其放大压电 DNA 传感器的检测信号可行性。

[基金项目] 国家高技术研究发展计划(863 计划,2007AA022005);全军医学科研"十一五"计划科技攻关项目(06G073)

[通信作者] 府伟灵,电话:(023)68754429,E-mail: weilingfu@yahoo.com

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 主要试剂 纳米金颗粒溶液(5 nm 粒径,链亲和素标记,90%,体积比,TBS 缓冲液稀释)购自美国 KPL 公司;牛血清白蛋白溶液(2% BSA,质量体积比,TBS 缓冲液溶解),新疆生化厂生产;无水乙醇,重庆川东化工(集团)有限公司生产;Piranha 溶液(30%,体积比,H_2O_2:浓 H_2SO_4 = 1:3),TBS 缓冲

液(含 Tris-HCl 0.01 mol/L, NaCl 0.2 mol/L, pH = 7.9),1 mol/L NaOH 溶液,均为本实验室自行配制。

1.1.2　合成寡核苷酸序列　　经计算机软件 Primer Premier 5 自行设计 DNA 探针、阳性靶序列及阴性靶序列,分别为 HS-$(CH_2)_6$-ACTGTCACCATAGGAGCCAT、biotin-ATGGCTCCTATG-GTGACAGT、biotin-ACTGTCACCATAGGAGCCAT,由大连 TaKaRa 公司合成,HPLC 纯化。

1.1.3　实验器材　　AT 切型石英晶振,13 mm × 13 mm 方片,厚度为 0.15 mm,基频为 10 MHz,双面镀金电极,金膜电极直径为 4 mm,由中国电子科技集团公司第 26 研究所生产制备。自行研发的便携式压电石英谐振检测仪,2 ×5 型阵列检测池,与晶体振荡电路连接后置于一屏蔽系统中,由中国嘉陵集团制造。自行开发的频率采集分析软件 PESA V5.0,具有实时采集频率、显示区间曲线、保存及导入历史数据等功能。

1.2　实验方法

1.2.1　石英晶振预处理　　将石英晶振放入 1 mol/L NaOH 溶液中浸泡 5 min,取出后用去离子水漂洗 3 次;然后将石英晶振放入 Piranha 溶液中浸泡 10 min,取出后用去离子水漂洗 3 次;最后将石英晶振放入无水乙醇中浸泡 5 min,取出后用去离子水漂洗 3 次,待干备用。

1.2.2　组装 2 ×5 型阵列检测池　　将预处理过的石英晶振用眼科镊夹住轻轻放入检测池内,使石英晶振有电极引脚的一面向下置于底座上,两端电极分别与底座的两片铜电极接触。然后将胶圈外环端置于石英晶振上,与其正面上圆形金膜构成同心圆;将垫圈套在胶圈上,使卡榫插入底座卡口上。最后旋上检测池上盖,压紧胶圈,固定住石英晶振,并保持合适的下压力。根据实验需要将若干组装好的检测池依次插入压电石英谐振检测仪 1 ~ 10 号通道的检测槽内,设通道 1 为空白对照,通道 2 为阴性对照,其余通道均检测阳性靶序列。

1.2.3　固定探针　　将 1 μmol/L 探针溶液 50 μl 从各检测池加样孔加入,覆盖石英晶振的整个金膜,贴上胶纸减缓液体挥发,室温作用 2 h,TBS 缓冲液清洗检测池 3 次。

1.2.4　封闭　　将 2% BSA 溶液 60 μl 从各检测池加样孔加入,覆盖石英晶振的整个金膜,贴上胶纸减缓液体挥发,室温作用 1 h,TBS 缓冲液清洗检测池 3 次。

1.2.5　杂交　　在各检测池中加入 90 μl TBS 缓冲液,观察频率波动情况,待其稳定后记录频率 f_1。然后将 TBS 缓冲液(空白对照)、10^{-7} mol/L 阴性靶序列溶液(阴性对照)、10^{-6}、10^{-7}、10^{-8}、10^{-9}、10^{-10}、10^{-11}、10^{-12} mol/L 阳性靶序列溶液 10 μl 依次从各通道检测池加样孔侧壁轻轻加入(终浓度分别为 10^{-7}、10^{-8}、10^{-9}、10^{-10}、10^{-11}、10^{-12}、10^{-13} mol/L),37 ℃杂交 30 min,观察频率波动情况,待其稳定后记录频率 f_2,得到放大前频移 $\Delta F' = f_2 - f_1$。

1.2.6　放大　　TBS 缓冲液清洗检测池 3 次,在各检测池中加入 90 μl TBS 缓冲液,观察频率波动情况,待其稳定后记录频率 f_3。然后将 90% 纳米金颗粒溶液 10 μl 的依次从各检测池加样孔侧壁轻轻加入(终浓度为 9%),37 ℃杂交 30 min,观察频率波动情况,待其稳定后记录频率 f_4,得到放大后总频移 $\Delta F = (f_2 - f_1) + (f_4 - f_3)$。各浓度组重复实验 3 次。

1.2.7　统计学分析　　采用 SPSS 13.0 统计软件进行配对样本 t 检验、单因素方差分析、线性相关性分析及一元线性回归分析。

2　结果

2.1　压电 DNA 传感器响应频率的实时检测

DNA 探针固定后,加入 10 μl 终浓度为 10^{-8} mol/L 阳性靶序列与之进行杂交反应,约 30 min 后反应达到平衡,杂交反应前后频移平均值约为 12.7 Hz。加入终浓度为 9% 的纳米金颗粒后,反应平衡时间约 30 min,放大反应前后频移平均值约 113.3 Hz,放大后总频移平均值约为 126 Hz。在空白对照、阴性对照实验中,杂交及放大反应前后频移值基本没有变化,见图 1 ~ 3。

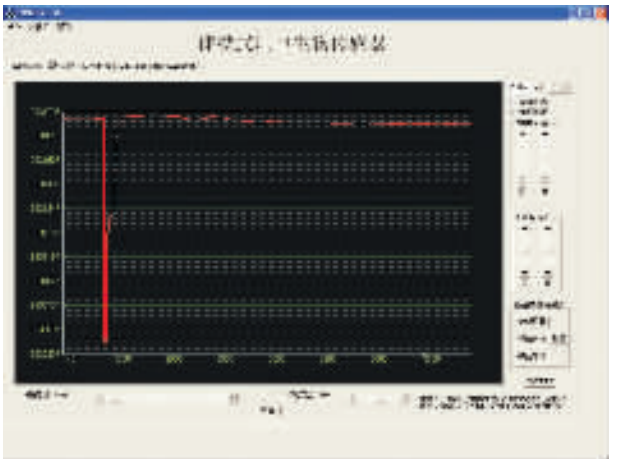


图 1　阳性靶序列与 DNA 探针杂交过程实时检测

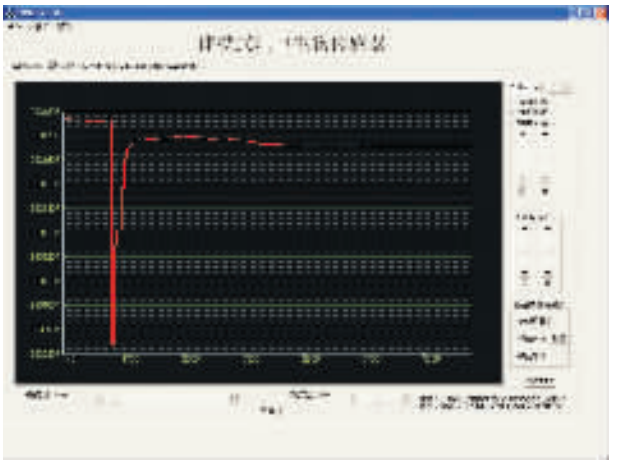
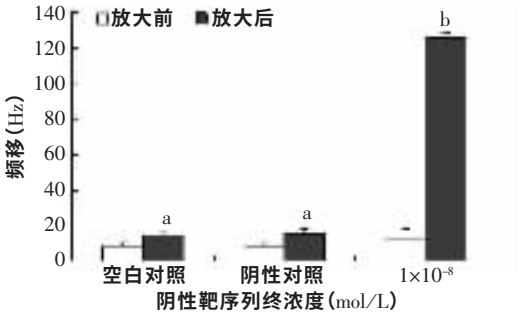


图 2　纳米金颗粒质量放大频移信号过程实时检测



a: $P < 0.01$,与 1×10^{-8} 放大后比较;b: $P < 0.01$, 与 1×10^{-8} 放大前比较

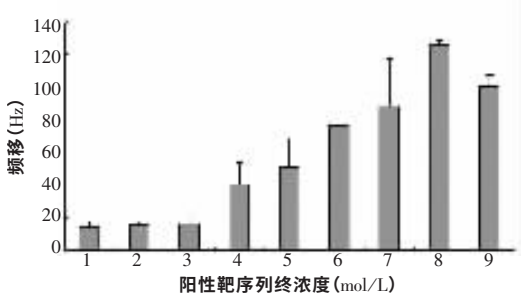
图 3　阳性靶序列在纳米金颗粒放大前后的频移信号

2.2 纳米金颗粒对频移信号的质量放大效应

我们选用配对样本 t 检验对图3中 10^{-8} mol/L 阳性靶序列组放大前后的频移进行了比较，发现纳米金颗粒放大后的总频移显著高于放大前的频移（$P<0.01$）。同时，选用单因素方差分析对放大后各组频移进行了比较，发现 10^{-8} mol/L 阳性靶序列组的频移显著高于空白对照与阴性对照组（$P<0.01$），而阴性对照组与空白对照组之间差异无统计学意义（$P>0.05$）。因此，我们认为纳米金颗粒对频移的质量放大效应具有统计学意义。

2.3 最低检出限实验

我们将阳性结果的阈值设为本底（空白对照）频移平均值加3倍标准差，即 $\bar{x}\pm3s$，为24.5 Hz。由图4可以看出，本研究中基于纳米金颗粒质量放大效应的压电 DNA 传感器对合成靶序列的最低检出限为 10^{-12} mol/L。



1：空白对照；2：阴性对照；3：1×10^{-13}；4：1×10^{-12}；5：1×10^{-11}；6：1×10^{-10}；7：1×10^{-9}；8：1×10^{-8}；9：1×10^{-7}

图4 不同阳性靶序列终浓度所对应的频移信号

2.4 频移与阳性靶序列终浓度相关性

通过线性相关性分析发现频移与阳性靶序列终浓度的 lg 值之间具有显著相关性。选用一元线性回归分析得到回归方程 $y=20.563x+282.36$（$r=0.974$，$P<0.01$），认为回归方程有意义。

3 讨论

压电生物传感器是基于压电谐振原理而构建的，具有非常高的灵敏度（可达到 pg 级），又称为石英晶体微天平（quartz crystal microbalance，QCM）。压电 DNA 传感器将压电生物传感器灵敏度高与 DNA 杂交反应特异性强的优势结合在一起，利用了石英晶体的逆压电效应来实现能量转换和传感，当石英晶体表面质量负载发生微小改变（Δm）即可引起谐振频率的变化（ΔF），即 Sauerbrey 方程：$\Delta F=-k\Delta m$，由此可以通过频率变化反映出与晶体表面 DNA 探针特异性结合的待测靶序列[2-4]。但由于 DNA 质量微小，其频移相对也较小，易被噪声所淹没[5]。在石英晶振金膜表面所固定的 DNA 探针与生物素标记的阳性靶序列进行特异性杂交后，我们应用5 nm 粒径、链亲和素标记的纳米金颗粒与之反应结合，即可增加石英晶振金膜表面的质量负载，从而降低响应频率，显著地放大压电 DNA 传感器的频移信号，进一步提高了信噪比，最低检出限达到 10^{-12} mol/L。同时，实验结果表明频移与阳性靶序列终浓度的 lg 值之间具有显著的一元线性关系，这为我们进行定量分析提供了依据。需要说明的是，本实验室前期的研究结果表明，该压电生物传感器具有良好的稳定性、重现性和再生性等性能，在液相环境下检测频率可稳定在 ±1 Hz 内，批内、批间变异系数（CV）分别为4.14%、5.95%，石英晶振再生10次后频移仍然保持在80%以上，测定 IgE 的平均回收率为105%[6]，并应用该传感器对蛋白质、病毒以及细菌基因组 DNA 等生物大分子进行了检测分析。虽然如此，有研究报道高基频晶振以及自动化流动池分析系统能进一步提高检测灵敏度和响应频率的稳定性[7]，另外，肽核酸探针（peptide nucleic acids，PNA）相比于 DNA 探针在特异性、亲和性等方面均具有明显的优势而成为 DNA 杂交检测研究的热点[8-11]。

基于上述研究我们认为，该方法可以有效地放大压电 DNA 传感器检测的频移信号，进一步提高检测的灵敏度，为下一步检测 PCR 产物打下了坚实的基础。

参考文献：

[1] Nie L B, Yang Y, Li S, *et al*. Enhanced DNA detection based on the amplification of gold nanoparticles using quartz crystal microbalance [J]. Nanotechnology, 2007, 18(30): 305501-305505.

[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] Sun H, Zhang Y, Fung Y. Flow analysis coupled with PQC/DNA biosensor for assay of E. coli based on detecting DNA products from PCR amplification[J]. Biosens Bioelectron, 2006, 22(4): 506-512.

[4] 夏涵，黄君富，姚春艳，等. 新型纳米金界面压电石英晶体 DNA 传感器的实验研究[J]. 中华医院感染学杂志，2008，18(3)：345-348.

[5] 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.

[6] Yao C, Qi Y, Zhao Y, *et al*. Aptamer-based piezoelectric quartz crystal microbalance biosensor array for the quantification of IgE[J]. Biosens Bioelectron, 2009, 24(8): 2499-2503.

[7] Sagmeister B P, Graz I M, Schwodiauer R, *et al*. User-friendly, miniature biosensor flow cell for fragile high fundamental frequency quartz crystal resonators[J]. Biosens Bioelectron, 2009, 24(8): 2643-2648.

[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] Wang Y, Chen M, Zhang L, *et al*. Rapid detection of human papilloma virus using a novel leaky surface acoustic wave peptide nucleic acid biosensor[J]. Biosens Bioelectron, 2009, 24(12): 3455-3460.

[10] 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.

[11] 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.

（**收稿**：2009-08-13；**修回**：2009-10-05）

（编辑 张 维）