DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.24.016

论著

文章编号:1000-5404(2003)24-2202-03

压电基因传感器检测巨细胞病毒PCR产物的实验研究

陈庆海[1],府伟灵[1],边志衡[1],陈 鸣[1],公衍文[1],赵文利[2],李晓文[3] (第三军医大学附属西南医院:[1]检验科;[2]儿科,重庆 400038;[3]重庆儿童医院新生儿科,重庆 400021)

提 要:目的 应用自行研制的压电基因传感器检测巨细胞病毒临床标本的PCR产物,探讨压电传感器检测核酸反应的可行性以及各种影响因素。方法 设计特异性DNA探针巯基法固定于传感器晶振表面并调节谐振频率在液相中稳定性达到±1 Hz,定量加入65份巨细胞病毒临床标本的PCR产物并观察核酸反应导致的频率变化情况,并与PCR产物的电泳结果作对照。结果 加入HCMV PCR阳性产物的传感器谐振频率明显下降,38例阳性产物的平均频率下降值为73.66 Hz,阴性产物的频率没有变化。与PCR电泳结果的阳性符合率为86.8%,阴性符合率为93.10%。结论 我们自主研发的压电基因传感器能有效地检测巨细胞病毒临床标本的PCR产物。

关键词:压电;石英晶体;基因传感器;巨细胞病毒
中图法分类号:R373;R394-33;R446.9 文献标识码:A

Experimental study of detecting PCR product of cytomegalovirus with piezoelectric gene sensor

CHEN Qing-hai, FU Wei-ling, BIAN Zhi-heng, CHEN Ming, GONG Yan-wen, ZHAO Wen-li, LI Xiao-wen (Department of Medical Laboratory, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To detect the PCR product of human cytomegalovirus (HCMV) using piezoelectric gene sensor made by ourselves and to explore the possibility and effect of detecting DNA reaction with piezoelectric sensor. **Methods** The specific DNA probe was immobilized on the surface of sensor and the stability of frequency was adjusted to ±1 Hz in liquid phase. The changes of frequency led by the PCR products of 65 clinical samples were observed and compared with the electrophoretic results of PCR products. **Results** The frequencies of the sensor after addition of PCR-positive products of HCMV decreased significantly. The average decrease of frequency in 38 PCR-positive products was 73.66 Hz. No change of the frequency in PCR-negative products was found. A total of 86.8% positive results but 93.10% negative results accorded with PCR results. **Conclusion** The piezoelectric gene sensor made by ourselves can be used for the detection of the PCR products of clinical samples with cytomegalovirus effectively.

Key words: piezoelectric; quartz crystal; gene sensor; cytomegalovirus

压电晶体是一种优良的传感材料,利用晶体表面的微质量变化所致频率改变原理而建立的质量效应型以及晶体受到液相物理、化学参量影响并作出响应的非质量效应型压电生物传感器是近年来迅速发展的一种新型传感器,具有响应灵敏、选择性好、便于自动化等特点[1]。人巨细胞病毒(Human cytomegalovirus,HCMV)感染对人类健康危害较大,尤以先天性感染、器官移植、艾滋病等的感染最重[2]。HCMV的PCR检测是目前临床诊断中应用最广泛的技术,我们应用自行研制开发的压电基因传感器成功检测了HCMV的PCR产物,显示了压电传感器在临床病原微生物检验中的良好应用前景。

基金项目:国家"863"计划重大专项基金资助项目(2002AARZ2023);国家"九五"科技攻关项目(96-A23-04-04);国家自然科学基金资助项目(30270388);全军"九五"课题(98MO94);全军"十五"课题(01MA180,01LO65);重庆市应用基础研究资助项目(2002-10-78),重庆市科委风险投资基金项目(0499405)

Supported by the National "863" Major Research Project of China (2002AARZ2023), the "Ninth Five-year Plan" for Sci & Tech Research of China (96-A23-04-04), the National Natural Science Foundation of China (30270388), the Research Project of the "Ninth Five-year Plan" of PLA (98MO94), the Research Project of the "Tenth Five-year Plan" of PLA (01MA180, 01LO65), the Research Project Foundation for Basic Research and Application of Chongqing (2002-10-78), and the Risk Investment Funds of Scientific Committee of Chongqing (0499405)

作者简介:陈庆海(1969—),男,广东省湛江市人,硕士,主治医师,主要从事生物传感器方面的研究,发表论文8篇。电话:(023)65460802

收稿日期:2003-09-15;修回日期:2003-11-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1　材料和方法

1.1　标本

巨细胞病毒标准株HCMV AD169由中国预防医学科学院病毒学研究所提供。巨细胞病毒临床标本共65份来源于本市3所医院。其中尿标本46份、血标本19份。标本取自以确诊患病、酶联免疫吸附试验(Enzyme linked immunosorbent assay，ELISA)检查IgM或IgG阳性、新生儿黄疸、器官移植术后等病人。

1.2　引物及探针设计

选择巨细胞病毒特异性片段IE sequence为模板，并运用PREMIER 5.0、DNAMAN软件设计了2条引物B1、B2，以其PCR产物(132 bp)为靶序列设计了探针DP1，引物及探针均经genebank验2证其特异性。以上引物及探针均由上海生物工程公司合成。

B1：5′-CGCTGACGCATTTGGA-3′；B2：5′-GCTCAGACTACACTGCCCTC-3′；DP1：5′-巯基-CGCTGACGCATTTGGA-3′

1.3　试剂与PCR仪

dNTP、PCR缓冲液和*Taq*酶均购自华美生物工程公司。PCR仪(GeneAmp PCR system 2400)。

1.4　压电基因传感器

我室与国家信息产业部电子第26研究所、中国嘉陵集团联合研制开发的压电生物检测仪系统(PESA Detecter-3000侦察兵)主要含：石英谐振式传感器及阵列、自激式振荡电路、PESA V2.0频率记录分析软件及数据采集系统、电源及温控系统及其他硬件系统等。

1.5　标本处理及PCR检测

血液1 ml加红细胞裂解液3 ml，4 500 r/min离心2 min去上清，沉淀加裂解液400 μl及25 μl蛋白酶K65温浴15～30 min，加异丙醇，放吸附柱中洗脱后作扩增。尿液300 μl加100 μl裂解液，冰浴过夜，1 500 r/min离心30 min去上清，沉淀加悬浮液100 μl煮沸10 min，14 000 r/min离心1 min，取上清扩增。引物S_1、S_2(20)各1 μl，dNTP(2)1 μl，双蒸水35 μl，10× PCR缓冲液5 μl，$MgCl_2$(25 mol/l)5 μl，*Taq*酶1 μl，模板1 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→49 ℃ 2 min→72 ℃ 30 s(35个循环)，经72 ℃延伸5 min，取10 μl扩增产物用2.0%琼脂糖凝胶电泳，以PBK 322 DNA Marker作分子量标准，溴化乙锭染色，紫外灯下观察，出现132 bp带为阳性。无条带者为阴性。

1.6　HCMV PCR产物在压电基因传感器的检测实验

1.6.1　仪器调试　选择表面光洁直径4.0 mm、厚度100 nm的圆形双面石英谐振传感器，基频10 MHz，在piranha液中浸泡10 min，双蒸水反复漂洗数次，N_2吹干。装入夹具式检测池调节至：气相稳定性±1 Hz，液相中±1 Hz。

1.6.2　探针固定　检测池加入pH 7.9的Tris-HCl缓冲液(含0.2 mol/l NaCl)约5 min至频率稳定。加入终浓度为0.1 μmol/L的探针反应，观察频率变化。探针固定后吸干缓冲液，加入6-巯基己醇封闭约10 min。双蒸水清洗3遍，N_2吹干。回空气中稳定至平衡。

1.6.3　产物检测　加入同样缓冲液，观察频率约5 min后稳定至±2 Hz。加入HCMV PCR产物：产物90 ℃变性5 min迅速冰浴，即刻加入至终浓度为1.0 μmol/L反应(另有实验显示1.0 μmol/L为较佳反应浓度)，记录反应所需的时间及频率的改变值。阴性对照加入同样体积缓冲液。实验检测了65份临床标本的HCMV PCR产物(其中38份阳性标本，27份阴性标本)。

2　结果

2.1　探针固定的频率变化模式

见图1，左箭头示加入探针点，右箭头示传感器表面探针饱和点，加入探针后频率缓慢下降约40 min后至稳定，下降幅度约20 Hz。

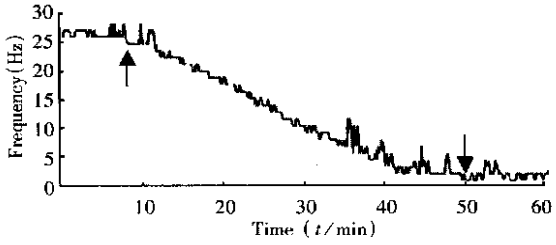


图1　探针固定所致的频率变化

Fig 1　Changes of frequency resulted from immobilization of the probe

2.2　加入HCMV PCR阳性产物后频率变化模式

见图2，左箭头处为样品加入点，右箭头示反应终止点，前约20 min内出现缓慢上升，上升幅度约10～50 Hz不定，20 min后开始出现较快速的持续下降，约15～20 min后达到新的稳定，下降幅度离最高点约50～80 Hz不定。整个反应过程约30～50 min。与此相对照的阴性标本频率变化不明显，基本呈一直线。

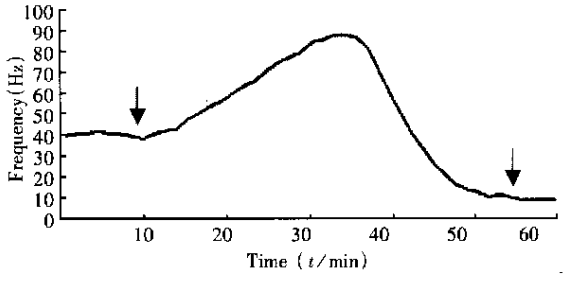


图2　传感器检测HCMV PCR阳性产物频率变化

Fig 2　Changes of frequency resulted from PCR-positive products of HCMV detected by the sensor

2.3　HCMV PCR阴、阳性产物及探针在传感器表面频率变化比较

压电传感器检测阴、阳性标本的初步定性对38份PCR阳性产物的检测频率下降均值73.66 Hz，PCR阴性产物的频率基本没有变化。通常以阴性产物频率下降值的95%可信区间±1.64 s上限作为阴、阳性定性临界值[3]，对29份PCR阴性产物的频率变化均值为(5.03±0.91) Hz，则该试验定性的频率下降临界值为6.04 Hz，传感器对检测结果可作初步定性，见图3。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

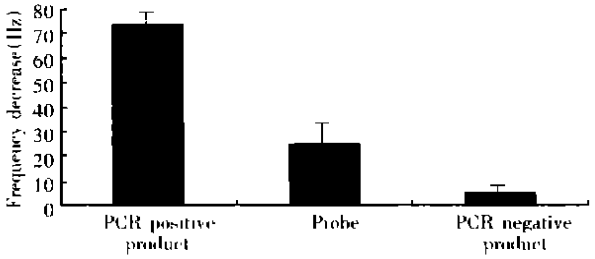


图3 HCMV PCR阴阳性产物及探针在传感器表面频率变化比较

Fig 3 Comparison of frequency changes on the sensor resulted from PCR-negative/positive products and probes

2.4 HCMV PCR检测与压电基因传感器对PCR产物检测结果

见表1,如以PCR定性结果作为标准,则压电基因传感器的阳性检出率86.8%,假阳性率为5.26%;阴性检出率93.10%,假阴性率17.2%。

表1 HCMV PCR电泳检测与压电基因传感器对PCR产物检测结果的对照

Tab 1 Comparison of the results by PCR electrophoresis of HCMV and by the gene sensor

PCR	Piezoelectric gene sensor	
Electrophoresis	Positive	Negative
Positive	33	5
Negative	22	7

3 讨论

基因诊断是现代医学中发展最快的检测方法,以灵敏、准确、快捷、微型化、经济实用著称的基因芯片技术是这一领域的杰出代表。基于压电谐振原理而构建的石英谐振式基因传感器是生物传感器大家族中的一员,它利用了石英晶体的压电效应来实现能量转换和传感。当晶体表面质量负载发生微小改变($\triangle m$)即可引起谐振频率的变化($\triangle f$),即Sauerbrey方程:$\triangle f=-k\triangle m$,由此可以通过频率变化反映出与晶体表面探针特异性结合的待测靶序列。由于压电传感器具有非常高的灵敏性(可达到ng级),固有质量微天平之称。石英谐振式基因传感器以其操作简便、成本低廉、费时较少、敏感性及特异性高等诸多优点,已成为国内外传感器领域研究的一个热点[4,5]。

传感器谐振频率在气、液相中的基频稳定性是后续实验的基础,一般气相中稳定性不难解决,但液相中由于受到流体运动、粘度、密度、介电常数、离子强度、pH值以及液固界面粘弹性、负载物水合状况等诸多因素影响,故液相中稳定性一直是一个世界性难题,国内外文献报道一般不低于±5 Hz[6]。我们自行研发的夹具式检测池则已超过了目前的水平,液相中频率稳定性达到±1 Hz,这就为后续实验奠定了坚实的基础。探针固定的方法有很多,课题组前期对探针固定方法已作了大量研究,该实验采用的硫醇化合物自组装固定法,通过DNA探针末端修饰的巯基与电极膜表面发生氧化反应生成化合键而将核酸探针固定于电极表面,其结合相当牢固且排列有序、分布均匀[7]。本实验对巨细胞病毒临床标本的检测中,阳性标本出现了明显的频率下降,早期多数出现的缓慢上升可能与加入时温差较大、液体粘度、液流及其他理化性质改变引起的非质量效应有关,如PCR产物待室温下加入,虽可减缓温差造成的频率上升,但因产物大部份复性故不能保证与探针互补结合的靶序列单链数量。为控制加入时冲击、温差、粘度差造成的频率变化幅度对反应的影响,理想的加标本条件应该是:微量、同温、粘度相同等,但实际操作中的矛盾是今后应逐步解决的难点。后期的急速下降则是靶序列与探针的迅速结合过程,最后逐渐趋缓,下降曲线与国外文献报道的呈指数下降曲线相符[8]。下降幅度及时间与探针、靶序列浓度、基频及晶片、电路等多种因素相关。

我们自行研制开发的具有自主知识产权的压电生物传感器已成功地应用于检测多种病源微生物及人体多种特异蛋白的实验研究,并正向临床实用化发展。但受到基频、晶片厚度、金膜厚度及直径、探针密度、缓冲液理化特性以及晶片及电路制作工艺等技术瓶颈限制,距实用化有一定距离。提高检测的灵敏度也需从以上方面综合探讨。由于该系统温控技术目前还难以保证作PCR变温循环时频率的稳定性,但可以保证恒温条件下的生物学反应不影响晶振基频的稳定性,恒温下对PCR产物的成功检测,从理论和实践上证实了压电生物传感器对恒温条件下的核酸、蛋白及抗原抗体反应检测的通用性。

参考文献:

[1] 姚守拙. 压电生物传感[J]. 生命科学研究, 1998,2(1):1-5.
[2] Ormrod D, Scott L J, Perry C M. Valaciclovir: a review of its long term utility in the management of genital herpes simplex virus and cytomegalovirus infections[J]. Drugs, 2000,59(4):839-863.
[3] 刘久成,冷泰俊. 医学科研方法学[M]. 成都:四川科学技术出版社,2000. 184-186
[4] Tatsuma T, Watanabe Y, Oyama N, *et al*. Multichannel quartz crystal microbalance[J]. Anal Chem, 1999,71(17):3632-3636.
[5] Abe T, Esashi M. One-chip multichannel quartz crystal microbalance fabricated by deep RIE[J]. Sens Actuators, 2000,82(2):139-143
[6] Ito K, Hashimoto K, Ishimori Y. Quantative analysis for solid-phase hybridization reaction and binding reaction of DNA binder to hybrids using a quartz crystal microbalance[J]. Anal Chem Acta, 1996,327(15):29-35.
[7] 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.
[8] Caruso F, Rodda E, Neil F D, *et al*. Quartz crystal microbalance study of DNA immobilization and hybridization for nucleic acid sensor development [J]. Anal Chem, 1997,69(8):2043-2049.

(编辑 栾 嘉)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net