DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.15.006
第25卷第15期 第三军医大学学报 Vol.25, No.15
1326 2003年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 200

论著

文章编号:1000-5404(2003)15-1326-03

缓冲液pH值对肽核酸压电基因传感器阵列杂交效应的影响

陈 鸣[1],府伟灵[1],刘明华[1],张 波[1],蒋天伦[1],陈庆海[1],汤万里[2],徐世军[2],蔡国儒[3] ([1]第三军医大学附属西南医院检验科,重庆 400038;[2]中国嘉陵集团设备工程公司,重庆 400032;[3]中国电子科技集团公司第二十六研究所第八研究室,重庆 400060)

提 要:目的 探索PBS缓冲液的pH值对肽核酸压电基因传感器阵列杂交效应的影响。方法 压电基因传感器阵列表面先固定上1.5μmol/L的bis-PNA探针,然后分别在pH 5.8~8.0的PBS缓冲液中和相应的靶序列杂交,记录频率的下降值及反应所需的时间。结果 随着pH值从5.8升到8.0,杂交导致的频率下降值先高后低,以pH 6.8为一个分水岭。杂交平衡时间在pH 6.8之前总体上说相差尚不明显,但当pH值从6.8升到8.0时,却骤然增加。结论 bis-PNA和靶序列dsDNA的杂交时适用的pH范围很窄(pH 6.6~7.0)。弱酸环境下(pH 6.8时)最为容易,pH超过7.5就不适宜杂交。结果从另一个侧面证实了在bis-PNA和dsDNA的杂交过程中"Hoogsteen链第一"的反应机制。

关键词:pH值;肽核酸;基因传感器;杂交
中图法分类号:R318;R363.1+3 文献标识码:A

Effects of pH values of buffer on hybridization efficiency with PNA piezoelectric gene sensor array

CHEN-Ming, FU Wei-ling, LIU Ming-hua, ZHANG Bo, JIANG Tian-lun, CHEN Qing-hai, TANG Wan-li, XU Shi-jun, CAI Guo-ru (Department of Clinical Laboratories, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of pH values of PBS buffer on hybridization efficiency with peptide nucleic acid (PNA) piezoelectric gene sensor array. Methods After 1.5 μmol/L bis-PNA probe was immobilized on the surface of gene sensor array, it was hybridized with the corresponding target sequence at pH values of PBS buffer ranging from 5.8 to 8.0. The decrease in frequency and the equilibrium time of reaction were recorded and analyzed. Results Frequency change due to hybridization increased first and then decreased when pH values of PBS varied from 5.8 to 8.0. pH 6.8 was the watershed. Equilibrium time for hybridization remained almost unchanged when pH value was lower than 6.8, but it increased suddenly when pH value range from 6.8 to 8.0. Conclusion The suitable pH range for smooth hybridization of bis-PNA and target dsDNA is quite narrow (about pH 6.6~7.0) but the most suitable one for hybridization is in slightly acid environment, *i.e.* pH 6.8. It is not suitable for hybridization if pH value surpasses 7.5. The opinion of "Hoogsteen-strand first" during the procedure of bis-PNA reacting with dsDNA is confirmed by our results from another point of view.

Key words: pH value; peptide nucleic acid; gene sensor; hybridization

传感器技术作为现代信息技术的支柱之一,自20世纪80年代以来,在全球范围内取得了飞速发展。将新兴的传感器技术和分子诊断技术相结合而成的生物传感器是现代临床诊断发展的一个新方向。由于生物传感器操作简便、检测准确、价格低廉等特点,近年来已经在医药卫生、环境监测等领域取得了突飞猛进的发展。基于压电谐振原理而构建的压电基因传感器就是生物传感器大家族中的一员[1,2]。它利用了石英晶体的压电效应来实现能量转换和传感。即当石英晶体的表面质量负载发生微小改变时,晶体谐振频率即可发生显著的变化,由此可极为敏感地探测出与晶体表面固定的探针分子发生特异性反应的待测靶序列。

但是,目前研究报道的压电基因传感器表面固定的都是DNA探针,这带来了两个无法克服的问题:一是灵敏度不够高,探针一般长20个碱基左右,在与较

基金项目:国家"九五"科技攻关项目(96-A23-04-04);国家自然科学基金资助面上项目(39870831);国家高技术计划生物技术领域青年基金资助项目("863"项目);全军"九五"医学科研计划资助面上项目(98MO94);全军"十五"医学科研计划资助面上项目(01MA180);全军"十五"医学科研计划指令性课题(01LO65);重庆市科委风险投资基金资助项目

作者简介:陈 鸣(1971-),男,福建省闽侯县人,博士,主治医师,讲师,主要从事临床实验诊断及相关仪器方面的研究,发表论文14篇。电话:(023)65460802

收稿日期:2002-07-26;修回日期:2003-04-17

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

长的靶序列杂交时(如一些病原微生物的靶序列一般有几千、上万个碱基), 由于结合力不够高而常使探针无法与靶序列杂交[3]。二是特异性不强, 经常有碱基错配的序列与之非特异性杂交。这两大问题已成为近年来制约压电基因传感器发展的"瓶颈"。

本研究室拟利用肽核酸(Peptide nucleic acid, PNA)在基因诊断领域得天独厚的优势, 设计和乙肝病毒(HBV)特异结合的 bis-PNA 探针, 固定在传感器金膜表面对 HBV 进行检测。本研究主要探讨缓冲液 pH 值对杂交效应的影响。

1　材料和方法

1.1　材料

1.1.1　压电基因传感器阵列检测系统　　由本室与中国嘉陵集团、中国电子科技集团公司第二十六研究所合作研制成功。系统由自激式振荡电路、频率记录分析软件、金属夹具式传感器阵列、信息缓冲器、计算机等部件组成。

1.1.2　试剂　　bis-PNA 探针序列: 5′-Bio-OO-TCCTTTTTT-OOO-TTTTTTCCT-Lys(O 为 linker 分子, Lys 为赖氨酸), 购自美国 Applied Biosystems 公司; W6571 病毒/液体样品 RNA/DNA 抽提试剂盒购自上海 Watson 生物工程公司; 3, 3′-二巯基丙酸、EDC、NHS、亲和素、乙醇胺均购自 Sigma 公司; 20 mmol/L PBS 缓冲液: 按不同的 NaH_2PO_4 和 Na_2HPO_4 的比例配置 pH 5.8、6.0、6.2、6.4、6.6、6.8、7.0、7.5、8.0 的 PBS; 细胞株: HepG2215 转基因细胞株由校免疫学教研室石统东博士转赠。

1.2　方法

① 培养 HepG2215 转基因细胞株, 并用 W6571 病毒/液体样品 RNA/DNA 抽提试剂盒从其分泌的上清液中提取 HBV 基因组 DNA。② 传感器阵列金膜表面的预处理金膜表面在 piranha 液(30% H_2O_2 : 浓 H_2SO_4 = 1∶3)中浸泡清洗 10 min, 取出后双蒸水反复清洗, 氮气吹干备用。③ 2×5 型压电传感器微阵列联入检测系统, 以生物素-亲和素交联的方法将 bis-PNA 固定在传感器阵列金膜表面, 步骤参见文献[4] 进行。④ 加入终浓度为 1.5 μmol/L 生物素化 bis-PNA 探针固定。⑤ 吸干清洗后 1 号至 9 号检测池分别加入终浓度为 1 mmol/L EDTA 和 pH 5.8, 6.0, 6.2, 6.4, 6.6, 6.8, 7.0, 7.5, 8.0 的 20 mmol/L PBS 缓冲液 90 μl, 10 号检测池加双蒸水作为阴性对照, 稳定约 30 min。⑥ 最后每个检测池各加入终浓度为 10μg/L HBV 基因组 DNA 靶序列反应, 记录频率的下降值及反应所需的时间。⑦ 实验重复 6 次以取平均值。

1.3　统计学处理

以 SPSS10.0 软件进行相应的 t 检验。

2　结果

2.1　HepG2215 转基因细胞株中 HBV 基因组 DNA 的提取

细胞株培养成功并从其培养上清液中抽提出了 HBV 基因组 DNA。

2.2　不同 pH 值的 PBS 缓冲液对杂交效应的影响

初步实验结果显示固定的 bis-PNA 探针和 HBV 基因组 DNA 反应时的 pH 值适用范围很窄, 随着 pH 值从 5.8 升到 6.8, 和 HBV 基因组 DNA 杂交时导致的频率下降值逐渐增高($P<0.05$), 而杂交平衡所用的时间也呈增高的趋势, 但总体来看相互之间相差尚不明显。而当 pH 值从 6.8 升到 8.0 时, 杂交时导致的频率下降值逐渐降低($P<0.05$), 而杂交平衡所用的时间却骤然增加(与 pH 6.8 时相比, 分别增加了近 4 倍和 10 倍), pH 8.0 的检测池未能检测到频率下降值。阴性对照池杂交时未见频率的下降。综合考虑, 以 pH 6.8 时得到的结果较为理想。具体结果见表 1。

表 1　不同 pH 值的 PBS 缓冲液对杂交效应的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Effect of PBS buffer at different pH values on hybridization reaction($\bar{x}\pm s$)

Different pH value	5.8	6.0	6.2	6.4	6.6	6.8	7.0	7.5	8.0
△f for target reaction (Hz)	28.2±5.2	43.5±5.9 **	54.7±6.9 *	66.3±8.5 *	79.3±11.8 *	104.0±14.8 **	74.5±9.0 **	63.2±7.1 *	-
Equilibrium time for target reaction (min)	15.2±5.0	27.5±6.4 *	29.3±7.3	36.3±6.9	41.7±6.6	46.5±9.0	169.5±13.8 **	448.3±17.3 **	-

△f: decrease of frequency; *: $P<0.05$ **: $P<0.01$ *vs* closely lower concentration group

3　讨论

PNA 是 1991 年 Nielsen 等[5] 借助计算机的辅助设计出的一种人工合成的 DNA 模拟物, 它一经出现就引起了轰动, 在基因诊断、环境监测、反义核酸研究等领域都显示了广阔的应用前景。作为 DNA 的模拟物, PNA 与 DNA 最大不同之处在于它们的骨架结构: DNA 是由磷酸二酯键连接形成的磷酸戊糖骨架; 而 PNA 的骨架则是由酰胺键连接的重复的 N-2-氨基已酸甘氨酸单位构成, 四种碱基通过亚甲基碳酰键连接到多肽骨架上[5]。由于 PNA 的这种中性骨架不带负电荷, 与 DNA 和 RNA 杂交时不存在静电斥力, 因而结合的稳定性和特异性都大为提高[6,7]。这就使其在基因诊断领域有得天独厚的优势, 目前已有报道利用 PNA 探针和荧光原位杂交技术相结合, 应用于细菌检测及环境监测、染色体异常性疾病的诊断; 利用 PNA 探针与基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)技术联用, 可用于单碱基多态性(SNP)及基因突变的检测, 还有将 PNA 用于"PCR 夹"技术检测基因突变; 以及将 PNA 用作"分子信标"的研究等。

PNA 除了可以与 DNA、RNA 单链分子按常规的碱基互补配对原则形成稳定的双链结构外[6,7], 由两条

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

PNA 单体连接成的 bis-PNA 还可通过“链侵袭”(Strand invasion)的模式直接和双链 DNA(Double-strand DNA, dsDNA)形成稳定性更高的四链体复合物[8~10]。“链侵袭”通常发生在多聚同源嘧啶 PNA 和相应的多聚嘌呤 dsDNA 靶序列之间。其结合模式为:bis-PNA 的一条链以 Watson-Crick 氢键的方式在 dsDNA 双螺旋内部与靶序列中的互补碱基以反向平行的方式结合,另一条链则以 Hoogsteen 键的方式在 DNA 双螺旋结构的大沟处与靶序列以正向平行的方式结合,原 dsDNA 中靶序列的互补片段则突出于复合物外,形成一个明显的“P 环”(P loop)的结构。在理论[11,12]和实际研究中,都证实了 bis-PNA 不仅可以高亲和力地和 dsDNA 形成稳定的 P 环结构,同时 bis-PNA 在识别 dsDNA 的过程中,还显示了很高的序列特异性。这非常符合临床检测的实际需要。

常规的适用于核酸分子间杂交的反应条件完全不适用于 bis-PNA 和 dsDNA 的杂交[13],因此反应条件应重新摸索并加以优化。在所有的影响因素中,缓冲液的 pH 值是最为重要的影响因素之一。从实验结果可以看出,随着杂交时缓冲液 pH 值从 5.8 升到 8.0,杂交导致的频率下降值先高后低,以 pH 6.8 为一个分水岭。值得注意的是,杂交平衡所用的时间在 pH 6.8 之前总体上说相差尚不明显,但当 pH 值从 6.8 升到 8.0 时,却骤然增加,在 pH 8.0 时虽经长时间观察(12 h)仍未能检测到频率下降值。说明在弱酸环境下 bis-PNA 和靶序列 dsDNA 的杂交最为容易,弱碱性的环境不利于杂交反应的进行。当 pH 值大于 7.5 时,已不适宜于杂交。我们认为这与本研究所用的 bis-PNA 的 Hoogsteen 链上含有两个胞嘧啶有关,由于在与靶序列 dsDNA 杂交时,这两个胞嘧啶需经质子化的过程才可与 dsDNA 靶序列上的鸟嘌呤形成氢键杂交上[8],因此弱酸性的环境恰恰有利于胞嘧啶的质子化。至于 pH 6.8 到 8.0 仅一个多 pH 的变化,反应所需时间却增加了近 4 倍、10 倍乃至测不出频率的变化的确切原因,尚需进一步从理论和实践上加以验证。

在 bis-PNA 和 dsDNA 的杂交过程中,始终存在着“Watson-Crick 链第一”还是“Hoogsteen 链第一”的争论:即 bis-PNA 在与 dsDNA 结合时,到底是 bis-PNA 中的 Watson-Crick 链还是 Hoogsteen 链先与 dsDNA 杂交上?先期的研究支持“Watson-Crick 链第一”的观点,认为杂交时,Watson-Crick 键的结合力要比 Hoogsteen 键强得多,因此 bis-PNA 中的 Watson-Crick 链当仁不让地先结合上 dsDNA[9]。但最近的研究更倾向于支持“Hoogsteen 链第一”的观点,因为在研究 Hoogsteen 链上含有胞嘧啶的 bis-PNA 与 dsDNA 的杂交过程中,发现 pH 值的降低极大地加速了反应进程,而 pH 值的降低恰恰最有利于 Hoogsteen 链上胞嘧啶的质子化过程。由此看来,Hoogsteen 链在与 dsDNA 的结合上应发挥着更为决定性的作用[10]。我们的实验结果也从另一个侧面证实了“Hoogsteen 链第一”的反应机制,当缓冲液 pH 值从弱碱性变至弱酸性的过程中,反应所需时间剧减。

Bis-PNA 探针与 dsDNA 杂交时,还有许多不同于 DNA 探针与 DNA 靶序列杂交时的条件要求,如离子强度、探针浓度的优化等(有关数据另文发表),通过这些反应条件的优化,我们有望构建出一个成熟的 PNA 压电传感器阵列检测系统,为临床上病原微生物的检测提供一种新的方法。

参考文献:

[1] Matsuno H, Niikura K, Okahata Y. Design and characterization of asparagine- and lysine-containing alanine-based helical peptides that bind selectively to A·T base pairs of oligonucleotides immobilized on a 27 mHz quartz crystal microbalance[J]. Biochemistry, 2001, 40(12): 3615—3622.

[2] Zhou X C, Huang L Q, Li S F. Microgravimetric DNA sensor based on quartz crystal microbalance: comparison of oligonucleotide immobilization methods and the application in genetic diagnosis[J]. Biosens Bioelectron, 2001, 16(1—2): 85—95.

[3] 刘明华, 府伟灵, 汪松林, 等. 压电基因传感器阵列的初步构建[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(7): 810—812.

[4] 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.

[5] Nielsen P E, Egholm M, Berg R H, *et al*. Sequence-selective recognition of DNA by strand diaplacement with a thymine-substituted polyamide[J]. Science, 1991, 254(5037): 1497—1500.

[6] Wittung P, Nielsen P E, Buchardt O, *et al*. DNA-like double helix formed by peptide nucleic acid[J]. Nature, 1994, 368(7): 561—563.

[7] Jensen K K, Orum H, Nielsen P E, *et al*. Kinetics for hybridization of peptide nucleic acids (PNA) with DNA and RNA studied with the BIAcore technique[J]. Biochemistry, 1997, 36(16): 5072—5077.

[8] Egholm M, Christensen L, Dueholm K L, *et al*. Efficient pH-independent sequence-specific DNA binding by pseudoisocytosin-containing bis-PNA[J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23(2): 217—222.

[9] Demidov V V, Yavnilovich M V, Belotserkovskii B P, *et al*. Kinetics and mechanism of PNA binding to duplex DNA[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(7): 2637—2641.

[10] Kuhn H, Demidov V V, Nielsen P E, *et al*. An experimental study of mechanism and specificity of peptide nucleic acid (PNA) binding to duplex DNA[J]. J Mol Biol, 1999, 286(5): 1337—1345.

[11] Demidov V V, Frank-Kamenetskii M D. Sequence-specific targeting of duplex DNA by peptide nucleic acids *via* triplex strand invasion[J]. Methods, 2001, 23(2): 108—122.

[12] Lomakin A, Frank-Kamenetskii M D. A theoretical analysis of specificity of nucleic acid interactions with oligonucleotides and peptide nucleic acids (PNAs)[J]. J Mol Biol, 1998, 276(1): 57—70.

[13] Nielsen P E. Peptide nucleic acid: a versatile tool in genetic diagnostics and molecular biology[J]. Curr Opin Biotechnol, 2001, 12(1): 16—12.

(编辑 刘洪娥)

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