DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.01.007
第24卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 1
12 2002年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)01-0012-03

靶DNA长度对压电传感器基因杂交效应的影响

刘明华[1],府伟灵[2],薛 强[2],黄 庆[2],汪松林[2] (第三军医大学附属西南医院:[1]ICU;[2]检验科;重庆 400038)

提 要:目的 探讨靶DNA长度对压电传感器基因杂交效应的影响。方法 在压电传感器阵列上固定20碱基的巯基DNA序列作为探针后分别与不同长度的含互补片段的靶序列进行杂交,计算机采集并分析传感器频率数据,比较各靶DNA长度下杂交达到平衡所需时间,杂交前后频率差,并计算杂交动力学参数。结果 随靶DNA长度增加,杂交时间有延长趋势。在靶DNA长度为20~108个碱基时,其频率变化值与碱基数呈线性关系,而225、379、654个碱基时的频率变化反应则明显降低。结合常数变化不明显,而解离常数呈增大趋势变化,使平衡常数逐渐减小。结论 在石英晶体传感器阵列上,频率变化值随靶序列长度增长而增大,但反应效率不一样。

关键词:核酸杂交;序列长度;压电晶体;传感器
中图法分类号:R446.5;TP212.3 文献标识码:A

Effects of target DNA chain length on hybridization efficiency with piezoelectric gene sensor

LIU Ming-hua, FU Wei-ling, XUE-Qiang, HUANG-Qing, WANG Song-lin (Department of Clinical Laboratories, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of the length of target DNA chain on hybridization efficiency in piezoelectric gene sensor arrays. **Methods** A gene sensor array of 2×5 was made with gene probes of 20 bases immobilized on gold coated surfaces, then 7 kinds of target DNA in different lengths were hybridized on it respectively. The changes of oscillation frequency of the crystal were collected and analyzed with aid of computer. The hybridization time, frequency alteration and kinetic parameters caused by the hybridization of DNA chains in various lengths were compared. **Result** Following the increase of target chain length, the hybridization time had a tendency of prolonging. For target DNA of 20 to 108 bases, the frequency difference (△F) showed a linear relation to the base number, but for target DNA of 225, 379 or 654 bases, the frequency was reduced and showed no obvious relationship, which was due to the elevation of dissociation constants. **Conclusion** In the piezoelectric gene sensor, the oscillation frequency of the crystal is increased following the increase of target chain length. Reduced frequency reaction for DNA sequence of longer target chain might be owing to lower rigidity on the crystal surface, easier formation of complicated steric construction and the intention of self-renaturation.

Key words: nucleotide hybridization; chain length; piezoelectric crystal; sensor

随着分子生物学在医学领域中的迅速发展,基因诊断已成为临床疾病诊断的重要手段之一。我们跟踪国内外研究进展,初步构建了临床基因检测的新方法,即压电传感器阵列基因检测系统[1]。在石英晶体电极表面固定探针后与靶序列进行杂交,从而检测靶序列的一些特性。靶序列的长度对传感器阵列上基因杂交效率的影响如何,本研究拟就此进行探讨。

1 材料和方法

1.1 试剂

Tris-HCl缓冲液,pH为7.9,浓度为10 μmol/L,含NaCl浓度为0.2 mol/L;去离子水;丙酮溶液(重庆化学试剂公司);6-巯基己醇(aldrich公司)。

1.2 核酸序列

序列1:19碱基探针:
5′HS-$(CH_2)_6$-CCAGGAATGCAGAAAGACC
序列2:序列8的探针
5′HS-$(CH_2)_6$-TCATAGCGTCATTATTCCAGG
序列3:序列9的探针
5′HS-$(CH_2)_6$-AATGGGACCAACATAACCTA
序列4:序列11的探针,
5′HS-$(CH_2)_6$-TGGCATTGTCATTGGTAGCG
序列5:20碱基,与序列1互补,
5′TGGTCTTTCT GCATTCCTGG
序列6:40碱基,3′端与序列1互补
5′ACTTCTCAAT AGGCTACGCT TGGTCTTTCT GCATTCCTGG
序列7:60碱基,3′端与序列1互补
5′TTTACGACGT TCTGAGGCCA ACTTCTCAAT AGGCTACGCT TGGTCTTTCT GCATTCCTGG
以上序列均由上海生工公司合成。
序列8:MRSA的mecA基因扩增产物(108碱基),含序列2互补区域。

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:刘明华(1966-),男,湖北省仙桃市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事临床感染方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68754106
通信作者:府伟灵(E-mail:weilingfu@yahoo.com)
收稿日期:2001-10-30;修回日期:2001-12-12

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

序列 9: MRSA 的 mecA 基因扩增产物(225 碱基), 含序列 3 互补区域。

序列 10: MRSA 的 mecA 基因扩增产物(379 碱基), 含序列 1 互补区域。

序列 11: MRSA 的 femA 基因扩增产物(654 碱基), 含序列 4 互补区域。

1.3　仪器

传感器阵列为 2×5, 其中压电晶体为 AT 切型, 被金, 基本频率为 10 MHz, 晶片直径 8.0 mm, 金膜电极直径 4.5 mm。传感器阵列与晶体振荡电路相连接后置于一屏敝系统之中, 而后通过数据采集电路系统将频率数据输入计算机进行储存和分析。

1.4　操作步骤

将每个检测池中的金膜以丙酮清洗 3 次, 而后以去离子水清洗 3 次, 氮气吹干, 与电路系统相连接, 在气相中测定其频率直到频率稳定。在 1～10 号检测池各加入 Tris-HCl 缓冲液 90 μl, 测定频率直到稳定。在 1～7 号检测池中加入探针 10 μl(0.5 μmol/L), 依次为: 序列 1、序列 1、序列 1、序列 2、序列 3、序列 1、序列 4, 8～10 号检测池各加入 Tris-HCl 缓冲液 10 μl, 观察 3 h。以去离子水清洗后, 在 1～10 号检测池中加入 1.0 mmol/L 6-巯基己醇 90 μl, 观察 1 h。吸净并以去离子水清洗各检测池, 氮气吹干, 气相中测定频率直至稳定。在 1～10 号检测池各加入 Tris-HCl 缓冲液 90 μl, 测定频率直到稳定。在 1～7 号检测池中加入靶序列 10 μl (0.5 μmol/L), 依次为: 序列 5、序列 6、序列 7、序列 8、序列 9、序列 10、序列 11。8、9 号检测池分别加入靶序列 7、10 各 10 μl (0.5 μmol/L), 作为处理对照, 10 号检测池加入含 0.2 mol/L NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液 10 μl, 作为空白对照。观察 2 h。上述操作共进行 6 次。

比较各长度序列时固定前后频率差、杂交所需时间、杂交前后的频率差。

1.5　杂交动力学参数的测定

基因杂交时杂交动力学可表述为:

$$[\text{probe}] + [\text{target}] \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} [\text{hybridication}]$$

在杂交开始后任意时刻 t 的杂交量 Δm_t 可以从下列方程得到[2]:

$$[\text{hybridization}]_t = [\text{hybridization}]_\infty (1 - e^{-(1/\tau)t})$$

$$\Delta m_t = \Delta m_{max} (1 - e^{-(1/\tau)t})$$

$$\tau^{-1} = k_1 [\text{target}]_0 + k_{-1}$$

$$k_a = k_1 / k_{-1}$$

其中 Δm_{max} 为靶核苷酸的最大杂交量, τ 为键合的松弛时间, $[\text{target}]_0$ 为靶序列的初始浓度, k_1 为结合速率常数、k_{-1} 为离解速率常数、Ka 为杂交平衡常数。在我们的实验中, $[\text{target}]_0$ 是 0.5 μmol/L, 而每个时刻的频率变化是已知的。利用实验数据和上述公式及 Sauerbrey 方程[3], 可以计算得到动力学参数 k_1、k_{-1}、K_a、Δm_{max}。

1.6　统计学处理

上述实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 t 检验进行统计学分析。

2　结果

2.1　不同靶序列长度时杂交平衡时间及所致频率变化比较

各探针固定后分别与相应靶序列(20、40、60、108、225、379、654 碱基)的单链 DNA 杂交, 频率变化达到相对平衡所需时间逐渐延长, 而杂交前与平衡时的频率差也明显增大, 在 20～108 个碱基时, 其频率变化值与碱基数呈近似线性关系(经 SPSS 分析软件处理为 Y=－1.27X－14.90, X 为碱基数, Y 为频率变化值), 而 225、379、654 个碱基时的频率变化反应则明显降低。10 号检测池频率无明显变化。具体见表 1, 图 1。

表 1　不同靶序列长度时平衡时间及频率变化比较

Tab 1　Hybridization time and crystal frequency changes in the hybridization of DNA in different lengths

Length of target DNA	Frequency shift by immobilization (Hz)	Hybridization time (min)	Frequency shift by hybridization (Hz)
20	48.2±4.3	27±3	46.7±7.4
40	48.2±4.3	33±3 **	80.2±8.5 **
60	48.2±4.3	35±3	91.9±10.3 *
108	51.4±7.8	40±5 *	144.6±15.3 **
225	50.2±8.3	44±6 *	161.4±18.8 **
379	48.2±4.3	45±7	186.7±19.3 **
654	49.4±8.4	49±8 *	222.5±22.5 **

*: $P < 0.05$,　**: $P < 0.01$ *vs* closely former group

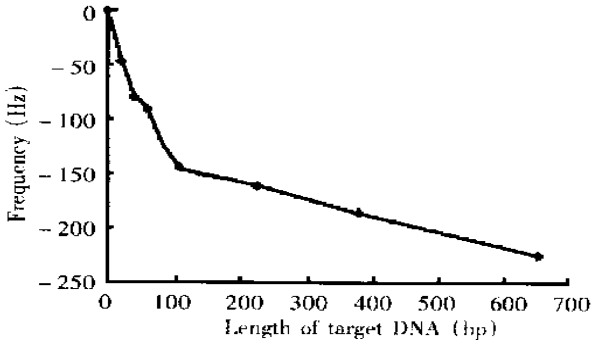


图 1　靶序列长度对频率变化的影响

Fig 1　Effect of target DNA length on the crystal frequency

2.2　杂交动力学参数测定

20 碱基的探针固定后分别与 20、40、60、108、225、379、654 碱基杂交, k_1 变化不明显, 而 k_{-1} 呈增大趋势变化, k_a 逐渐减小, Δm_{max} 均有增大, 见表 2。

表 2　不同靶序列长度时基因杂交动力学比较

Tab 2　Kinetic parameters of DNA hybridization for different chain lengths

Bases of target DNA	k_1 $10^3(\text{mol/L})^{-1}\cdot s^{-1}$	k_{-1} $10^{-3} s^{-1}$	k_a $10^6(\text{mol/L})^{-1}$	Δm_{max} (ng/cm^2)
20	50.83±7.44	1.11±0.19	45.34±5.26	215.38±29.65
40	71.67±10.85 *	1.72±0.27 *	44.42±5.06	369.59±39.13 *
60	107.53±15.34 *	1.88±0.45	57.91±9.61	411.63±42.17 *
108	132.46±15.43	3.08±0.54 *	43.97±6.24 *	661.68±57.81 *
225	144.67±17.85	3.92±0.47 *	39.43±5.06 *	753.73±59.33
379	116.28±14.51	3.37±0.37	35.09±5.32 *	834.22±78.57 *
654	120.83±45.31	4.91±0.51 *	24.94±4.47 *	1048.67±68.75 *

*: $P < 0.05$,　**: $P < 0.01$ *vs* closely former group

3　讨论

石英压电传感器又称石英晶体微天平(QCM), 对

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

质量变化非常敏感，能够检测微观过程中的微小变化。压电基因传感是近年发展起来的一种新的基因检测手段[4]，其原理在于：晶体表面基因杂交后的质量变化（△M）与其引起的晶体谐振频率变化（△f）之间存在函数关系，在一定的范围内，我们可用 $\triangle f = -k\triangle m$ 这一简化了的 Sauerbrey 方程式来表示[3]。压电基因传感器是通过频率的变化反映基因杂交的情况，不需要标记，并且可实时监测。本实验利用巯基化合物自组装单分子层的原理，在 DNA 探针的 5′末端修饰一个巯基，通过巯基在金表面发生氧化反应生成硫金化合键，将核酸探针牢固、有序、均匀地固定于基因传感器的金膜电极表面[5,6]，而后加入靶序列与之进行杂交。

两条互补的 DNA 单链在一定的条件下进行杂交，当探针的长度、GC 含量及与靶序列互补配对的碱基数量相对稳定时，其杂交效应与靶 DNA 的长度直接相关。从实验数据可知，随靶序列长度增加，在压电传感器上基因杂交时间有延长趋势，杂交之前与杂交平衡后的频率差值逐渐增大。杂交速度快慢主要与 DNA 分子的扩散速度有关，在浓度一样的情况下，靶分子链越长，则扩散越慢，与固定于金膜电极上的探针完成杂交的时间就越长。靶序列长度不一样，其杂交频率效应也会不相同，我们对此也进行了探讨。实验以 20 个左右碱基的单链核苷酸为探针，分别与人工合成的单链（20、40、60 个碱基）及多聚酶链反应的产物（108、225、379、654 个碱基）进行杂交检测，各序列的摩尔浓度值相同。结果表明，在 20～108 个碱基时，其频率变化值与碱基数呈线性关系，而 225、379、654 个碱基时的频率变化反应则明显降低。分析其原因，大致可从以下几个方面进行探讨。

首先从杂交动力学上看：结果显示靶核酸链越长，离解速率明显增大，而结合速率变化不明显，所以长链靶序列平衡常数下降，杂交效率降低。此结果说明 225～654 个碱基的长链靶序列并不会因链长及空间结构的关系而抑制其与探针的结合；长链离解速率增大的可能原因是：一方面实验所用长链均为 PCR 产物，为双链，变性后与探针结合的同时也会产生自我复性，而实验所用短链为人工合成的单链，不存在自我复性的问题。从这一点看，也许用纯粹的长链 DNA 单链分子作靶序列会得到不同的结果。另一方面，与 20 碱基的探针结合后，由于长链自身更易形成较复杂的空间构象，因此可能比短链更有离解倾向。当然因长链分子量大，虽然杂交效率降低，最后总的质量变化仍较大，频率变化值仍会增加。

其次从压电传感器检测的原理及其适用范围分析：Sauerbrey 方程[3] 有一个前提即假定石英晶片上均匀沉积的涂层薄膜等效于增加同样质量的一层石英。即要求薄膜与石英是刚性结合的，也就是说电极表面上的质量在晶体振荡时不经受任何剪切形变，这样便可忽略膜层对于石英晶体密度和弹性的差异。另外，有研究表明，表面涂层单位面积的质量与石英晶体单位面积质量之比应该不大于 2%[7]。短链 DNA 分子因具有一定的刚性，且固定后在晶片上是成膜的，又固定的寡核苷酸探针的质量相对晶体自身质量而言非常小，因此能够满足 Sauerbrey 方程的实验要求。但当核苷酸链的长度达到一定程度时，其刚性程度就会下降及涂层质量有可能大于 2%，因此其频率变化与负载质量之间就不一定呈直线关系。Okahata 等[2] 的结论与我们相同，他们认为其原因在于长 DNA 链在电极表面容易形成折叠结构。

实验中非杂交引起的质量效应可能会造成一定的频率效应。本实验应用 6-巯基己醇封闭金膜表面，消除了 DNA 与金膜的非巯基结合，使非杂交引起的质量效应降为最低[8]。当然石英压电传感器除了有质量效应之外，还存在有非质量效应，液相振荡时非质量因素（靶序列浓度不同，杂交液体的密度和粘滞度也会有所不同）对频率也有一定的影响[7]，我们从设计电路及实验操作方面入手，尽量减少非质量因素对频率的影响，实验中处理对照组和空白对照组在杂交实验阶段频率均无明显变化，显示实验所测频率基本为杂交所致的净频率效应。

参考文献：

[1] 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.

[2] Okahata Y，Kawase M，Niikura K，*et al*. Kinetic measurements of DNA hybridization on an oligonucleotide immobilized 27-MHz quartz crystal microbalance[J]. Anal Chem，1998，70(7)：1 288－1 296.

[3] Sauerbrey G. Use of vibrating quartz for thin film weighing and micro weighing[J]. Z Phys，1959，155：206－222.

[4] 刘明华，黄 庆，府伟灵. 压电基因传感器研究进展[J]. 国外医学：临床生物化学与检验学分册，2001，22(5)：259－260.

[5] 邓文礼，杨大本，方 晔，等. 硫醇在 Au(111)上的 SA 单分子层膜研究[J]. 中国科学(B辑)，1996，26(2)：174－180.

[6] 董献堆，陆君涛，查全性. 巯基化合物自组装单分子层的研究进展[J]. 电化学，1995，1(3)：248－258.

[7] 姚守拙 著. 压电化学与生物传感[M]. 长沙：湖南师范大学出版社，1997. 172－231.

[8] Herne T M，Tayloy M. Characterization of DNA probes immobilized on gold surface[J]. J Am Chem Soc，1997，119(38)：8 916－8 920.

（编辑 王 红）

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