DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.01.009
第24卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 1
2002年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2002

文章编号:1000-5404(2002)01-0017-03

论著

基因传感器表面两种探针固定法的比较

陈 鸣[1],府伟灵[1],张 波[1],蒋天伦[1],俞丽丽[2],刘明华[1],俞 凡[3],陈小兵[3] (第三军医大学:[1]附属西南医院检验科,重庆 400038;[2]附属大坪医院野战外科研究所妇产科,重庆 400042;[3]信息产业部电子第26研究所,重庆 400060)

提 要:目的 比较基因传感器表面两种探针固定法的优劣。方法 分别用巯基固定法及生物素-亲和素固定法将人类乳头瘤病毒(Human Papilloma Virus, HPV)的探针固定在基因传感器的金膜表面,比较不同探针浓度、不同靶序列浓度下反应所引起的频率的变化以及所用的时间。结果 两种固定方法检测靶序列的灵敏度相当。生物素-亲和素法反应所需的时间较短,且具有放大效应,能结合上更多的探针并检测到更多的靶序列,但操作较为繁琐。巯基法操作较为简单,但所需的反应时间较长。结论 两种探针固定法各有利弊,实际操作中应根据不同的需要选择合适的固定方法。

关键词:传感器;人类乳头瘤病毒;探针;生物素-亲和素
中图法分类号:R318;TP212.3 文献标识码:A

Comparison between 2 probe immobilization methods on the surfaces of piezoelectric gene sensors

CHEN Ming, FU Wei-ling, ZHANG Bo, JIANG Tian-lun, YU Li-li, LIU Ming-hua, YU Fan, CHEN Xiao-bing (Department of Clinical Laboratories, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To make comparison between the 2 methods for immobilizing probe on the surfaces of piezoelectric gene sensors. Methods Human papilloma virus (HPV) probe was immobilized on the gold surface of gene sensor array with thiol method and biotin-avidin method, respectively. The changes of frequency and time-cost were compared in reactions with different concentrations of probe and target sequences. Results The sensitivity of 2 methods was comparative. The biotin-avidin method took less time to react with target sequence and immobilized more probe, and hence combined more target sequence, but with tedious procedures. While thiol method was simple but much more time-costing for reaction. Conclusion The 2 immobilization methods both have their own advantages and disadvantages. Suitable method should be chosen in the practice according to different requests.

Key words: sensor; human papilloma virus; probe; biotin-avidin

人类乳头瘤病毒(HPV)有多种亚型,可引起人体的多种疾病,其中的6型、11型能引起一种常见的性传播疾病——尖锐湿疣,预防和早期诊断是治疗这种疾病的首选。传统的诊断方法存在着敏感性低、特异性欠佳等种种缺陷。目前,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,发达国家已形成了传感器产业,在基础研究、应用研究、新产品开发和商品化等方面都取得了惊人的进展[1]。其中的压电石英谐振式传感器是利用1880年居里兄弟发现的压电现象而发展来的一种传感器,它利用了石英晶体在表面的质量负载发生微小改变时,晶振的谐振频率即可发生变化的原理,可极为敏感地探测出与晶体表面固定的生物识别分子发生特异性反应的待测生物大分子。其理论基础是基于Sauerbrey[2]在1959年建立的质量效应型石英晶体传感器的频移-质量关系式:$\triangle f = -K \triangle m f^2 / A$。其中$\triangle m$是质量负载的改变(以g为单位),$\triangle f$是$\triangle m$改变所造成的频率变化,f为石英晶体的基频(以Hz为单位),A是石英晶体电极的表面积(以cm^2为单位),负号表示质量的增加导致频率的下降。

本实验利用我们自行研究设计的压电传感器阵列(Piezoelectric sensor array, PESA),在传感器表面分别用巯基固定法、生物素-亲和素法两种方法固定上设计好的检测HPV的探针,对其相应的靶序列进行了检测。并具体比较了两种方法的优缺点,旨在为今后压电基因传感器阵列的研制打下一个基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 PESA 由我室与国家信息产业部电子第26研究所合作研制成功。石英晶体采用AT切向,晶片直径8.0 mm,基频为10 MHz,晶片两面蒸镀金膜电极,直径4.0 mm。采用粘胶

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,博士研究生,主治医师,主要从事基因传感器方面的研究,发表论文9篇。电话:(023)68753687
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

将石英晶片粘结在预埋电路的 2×5 个孔的印刷板上，形成检测池的底部，晶体两面的金膜电极直接通过插头与检测电路连接，制成 2×5 型 PESA，每个检测池的容积为 150 μl，见图 1。

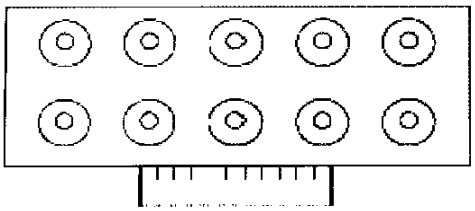


图 1 2×5 型压电传感器阵列结构示意图

Fig 1 Construction of a 2×5 piezoelectric sensor array

1.1.2 检测电路 由我室与国家电子信息产业部第 26 研究所共同设计。采用自激式振荡电路，2×5 型阵列通道，频率信号为 TTL 电平输出。电路封装于一不锈钢外壳中，具有电磁屏蔽、防震等功能。

1.1.3 频率记数卡及 PESA 分析软件 V2.0 频率记数卡为美国 ADLINK 公司的 ACL-8454 型多功能记数卡。PESA 分析软件 V2.0 由本室自行研发，具有自行设置各初始参数，实时记录频率变化、自动绘制频率变化趋势图及分析结果等多项功能，采集、分析后的数据自动输入到计算机。

1.1.4 试剂 3，3′-二巯基丙酸、1-乙基-3-(3-二甲氨丙基)-碳二亚胺(EDC)、N-琥珀酰亚胺(NHS)、亲和素、乙醇胺均购自 Sigma 公司。HPV 探针：5′ 端带巯基基团的探针 P1，序列为 5′ SH-CATCCGTAACTACATCTTCCA；5′ 端带生物素的探针 P2，序列 5′ Biotin- CATCCGTAACTACATCTTCCA。靶序列 T1，序列为 5′ TG-GAAGATGTAGTTACGGATG。购自上海生工。其余常规试剂均为分析纯级。

1.2 实验方法

1.2.1 石英晶振金膜表面的预处理 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。

1.2.2 巯基固定法

1.2.2.1 探针浓度的影响 2×5 型石英晶体传感器微阵列先在空气中稳定 0.5 h，每个检测池加入 pH 7.9 的 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(含 0.2 mol/L NaCl 液)稳定约 0.5 h，1～9 号池分别加终浓度为 0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1.0、1.5、2.0、4.0 μmol/L 的 P1 探针反应。10 号池加 Tris-HCl 缓冲液作为空白对照。探针固定后吸干缓冲液，双蒸水清洗 3 遍，氮气吹干。回空气中稳定 20 min 后再加入同样的缓冲液稳定约 0.5 h，最后加入终浓度为 1.0 μmol/L 的 T1 序列反应。记录反应所需的时间及频率的改变值。实验重复 7 次以取平均值。

1.2.2.2 靶序列浓度的影响 操作步骤同上，探针固定的终浓度统一为 1.0 μmol/L，最后同样在 1～9 号池分别加入同样浓度梯度的 T1 靶序列反应。10 号池加 Tris-HCl 缓冲液作为空白对照。同样记录反应所需的时间及频率的改变值。实验重复 7 次以取平均值。

1.2.3 生物素-亲和素固定法 2×5 型石英晶体传感器微阵列先在空气中稳定 0.5 h，加入 5 mmol/L 3，3′-二巯基丙酸反应约 0.5 h 使金膜表面包被上羧基基团，吸干双蒸水清洗后加入 10 μg 的 EDC 和 10 μg 的 NHS 反应约 20 min，吸干清洗后直接加入 10 μg 的亲和素反应约 1 h 使其吸附在金膜表面，再次吸干清洗后加入 1 mol/L 的乙醇胺 100 μl，反应 0.5 h 以灭活金膜表面残余的羧基基团。清洗后加入 pH 7.9 的 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液(含 0.2 mol/L NaCl 液)稳定约 0.5 h 后加入生物素化探针 P2 固定，吸干清洗后再加入同样的缓冲液稳定约 0.5h，最后加入 T1 靶序列反应。

与巯基固定法一样测定在相同的探针浓度梯度、靶序列浓度梯度下反应所需的时间及频率的改变值。所不同的是测探针浓度影响时加的 T1 终浓度为 2.0 μmol/L，而测靶序列浓度影响时探针量统一加 2.0 μmol/L。实验同样重复 7 次以取平均值。

1.3 统计学处理

以 SPSS 10.0 统计学分析软件进行相应的 t 检验。

2 结果

两种固定方法在不同的探针浓度梯度下，和靶序列反应所需的时间及频率的改变值见表 1。探针浓度在 0.005 μmol/L 时，传感器未能测出任何频率的变化；随探针浓度的增加，其固定以及和靶序列杂交引起的频率变化值均有上升的趋势，杂交反应所用的时间有下降的趋势。但在高浓度区(巯基法＞1.0 μmol/L，生物素-亲和素法＞2.0 μmol/L)，出现了相反的趋势。10 号池各阶段频率变化均在 10 Hz 以内。

表 1 两种方法下不同探针浓度的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Effect of different concentrations of probe immobilized by 2 methods ($\bar{x}\pm s$)

[Probe] (μmol/L)	△f for probe immobilization(Hz)		Equilibrium time for target reaction(min)		△f for target reaction(Hz)	
	1^+	2^{++}	1^+	2^{++}	1^+	2^{++}
0.005	——	——	——	——	——	——
0.01	13.9±1.9	14.6±1.9	51.7±4.9	39.9±3.3△△	15.9±2.3	16.4±1.7
0.05	28.7±2.1**	24.9±2.3**	50.3±3.9	36.6±3.1*△△	29.6±3.0**	25.7±2.3**
0.1	36.9±2.7**	34.1±2.5**	42.9±3.0**	33.6±2.9*△△	37.3±3.3**	35.1±2.7**
0.5	40.8±3.0*	40.1±3.3**	38.1±2.3*	31.1±2.0△△	48.1±3.9**	41.4±3.5**
1.0	60.4±4.7**	47.1±3.5**	34.1±2.1*	27.1±2.4**△△	60.1±5.0**	47.7±4.1**
1.5	45.7±2.7**	56.1±4.1**	38.3±3.4*	25.1±2.8△△	45.7±3.0**	57.1±5.0**
2.0	46.1±2.7	71.4±4.5**	39.3±3.5	21.1±1.9**△△	43.1±3.1	73.6±5.9**
4.0	44.7±2.4	57.1±3.3**	38.1±3.1	26.1±2.8**△△	44.6±3.2	56.3±3.5**

1^+: Thiol immobilization method; 2^{++}: Avidin-Biotin immobilization method; △f: decrease of frequency; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* closely lower concentration group; △△: $P<0.01$ *vs* 1^+

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

两种方法在不同的靶序列浓度梯度下反应所需的时间及频率的改变值见表 2, 靶序列浓度在 0.005 μmol/L 时, 传感器未测出频率的变化; 随浓度的增加, 其杂交反应引起的频率变化值均有上升的趋势, 所用的时间有下降的趋势。但在高浓度区(巯基法> 1.0 μmol/L, 生物素-亲和素法> 2.0 μmol/L), 出现了相反的趋势。10 号池各阶段频率变化同样均在 10 Hz 以内。

表 2　两种方法下不同靶序列浓度的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Effect of different concentrations of target sequence with 2 immobilization methods ($\bar{x}\pm s$)

[Target] (μmol/L)	Equilibrium time for target reaction (min)		△f for target reaction (Hz)	
	1^{+}	2^{++}	1^{+}	2^{++}
0.005	——	——	——	——
0.01	48.5±4.4	40.7±4.8△△	15.1±2.9	15.9±1.9
0.05	47.3±3.7	37.1±4.0 *△△	27.0±2.6 **	25.9±2.7 **
0.1	41.9±3.3 **	36.3±3.3△△	32.1±3.2 *	35.3±2.8 **
0.5	38.4±2.1	32.9±2.1 *△△	51.3±5.0 **	40.1±2.8 *
1.0	34.1±1.9 *	27.9±2.1 **△△	60.1±5.3 **	48.3±3.8 **
1.5	42.4±3.8 **	24.7±1.7△△	48.3±4.1 **	58.6±4.8 **
2.0	45.1±4.9	21.1±2.3 *△△	43.6±3.6 *	73.4±6.9 **
4.0	45.0±3.6	26.3±2.2 **△△	42.9±3.7	54.3±3.7 **

1^{+}: Thiol immobilization method; 2^{++}: Avidin-Biotin immobilization method; △f: decrease of frequency; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* closely lower concentration group; △△: $P<0.01$ *vs* 1^{+}

3　讨论

随着分子生物学的迅猛发展和人类基因组计划的顺利实施, 基因诊断已经成为现代医学的最重要和准确的检测方法, 而且随着各模式生物及越来越多的病原微生物的基因组序列的获得, 基因诊断必将扮演越来越重要的角色。在形形色色的基因诊断方法中, 基因传感器的方法是近年来新兴的一种很有发展前途的基因诊断方法, 基于压电谐振原理而构建的石英晶振传感器就是传感器大家族中的一员。在我们前期的研究中[3], 对包括离子强度、温度、碱基不匹配程度、靶序列长度等影响因素进行了具体地摸索并对其进行了优化。探针在传感器表面的有效固定是基因传感器进行准确检测的前提, 有多种固定方法可达到这目的; 可利用 LB 膜技术将探针固定上[4], 也可通过含基因探针的叠氮化合物将探针固定在金膜表面[5], 本研究采用了更为常见的巯基固定法[6,7] 及生物素-亲和素法[8], 并对其进行了比较。

生物素-亲和素法的优缺点: 从比较结果可看出: 生物素-亲和素法到达杂交反应平衡的时间比巯基固定法要短得多(两种方法在各个浓度点相对比, P 值均 <0.01), 这是它的一个最主要的优点。究其原因, 与基因探针距金膜表面的空间距离有直接的关系, 据文献[8] 报道, 金膜表面在经过亲和素处理, 探针 5′端又连上生物素后, 基因探针与金膜的距离已达 5 nm; 而如果直接将巯基化探针固定在金膜上, 探针距离金膜仅 0.4 nm。空间距离的增加使金膜表面对核酸杂交时的空间位阻效应降低, 探针与靶序列杂交时更加顺利, 反应时间缩短。生物素-亲和素法的另外一个优点是由于生物素-亲和素的放大效应, 在金膜表面连接的亲和素可结合上更多生物素化探针, 这有利于结合更多的靶序列, 从而引起更强烈的频变效应。从实验结果也可以看出: 固定的探针量在达到 2.0 μmol/L 时, 固定引起的频率下降才达最高值, 结合的靶序列量也是在 2.0 μmol/L 时, 杂交反应引起的频率下降才达最高值。但同时, 生物素-亲和素法由于要对金膜表面进行多步的预处理, 因而操作较为繁琐。

巯基法的优缺点: 巯基固定法是利用 Au-S 之间很强的化学键合力(键能高达 184 KJ/mol)来保证结合的选择性。巯基化探针能在金膜表面形成一层均匀稳定的自组装单分子层(有关数据另文发表), 其分子排列和 LB 膜一样紧密有序, 可以和相应的靶序列发生稳定的结合, 而且巯基法操作起来较为简单, 因而也有自己的特点。两种方法在探针及靶序列的高浓度区的频率变化均出现了相反的趋势, 我们推测与探针的空间排列结构及 DNA 分子间的静电排斥有关。

总之, 这两种固定方法检测靶序列的灵敏度相当, 且都是基于共价键的方式将探针连接到金膜表面, 因而结合都非常牢固。两种方法各有优缺点, 具体采用何种方法固定基因探针, 还得根据具体的情况进行详尽的分析。

参考文献:

[1] Vaezi-Nejad S M. A random walk in sensors, recent advances and market opportunities[J]. Measurement and Control, 1998, 31(1): 80－85.

[2] Sauerbrey G. Use of vibrating quartz for thin film weighing and microweighing[J]. Z Phys, 1959, 155(2): 206－222.

[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] Nicolini C, Erokhin V, Facci P, *et al*. Quartz balance DNA sensor[J]. Biosens Bioelectron, 1997, 12(7): 613－618.

[5] Campbell NF, Evans JA, Fawcett NC, *et al*. Detection of poly (U) hybridization using azido modified poly (A) coated piezoelectric crystals[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1993, 196(2): 858－863.

[6] Umek R M, Lin S W, Vielmetter J, *et al*. Electronic detection of nucleic acids: a versatile platform for molecular diagnostics[J]. J Mol Diagn, 2001, 3(2): 74－84.

[7] Bamdad C. A DNA self-assembled monolayer for the specific attachment of unmodified double- or single-stranded DNA[J]. Biophys J, 1998, 75(4): 1 997－2 003.

[8] Yoshio Okahata, Masanori Kawase, Kenichi Niikura, *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.

（编辑　王　红）

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