DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.01.013
第24卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 1
26 2002年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)01-0026-03

链置换扩增(SDA)压电DNA传感器

蒋天伦[1],府伟灵[1],张 波[1],陈 鸣[1],刘明华[1],张 雪[1],赵树铭[2],俞 凡[3],陈小兵[3] (第三军医大学附属西南医院:[1]检验科;[2]输血科;重庆 400038;[3]信息产业部电子第26研究所,重庆 400060)

提 要:目的 构建链置换扩增(SDA)压电DNA传感器,研究其响应特性。方法 ①将SDA与压电DNA传感器结合,建立SDA压电DNA传感器结合技术;②以结核菌IS6110片段为检测对象,研究SDA压电DNA传感器的响应特性。结果 ①SDA压电DNA传感器的响应信号达到500 Hz左右;②SDA压电DNA传感器出现频率下降的时间长度(响应时间)与加入的检测核酸的浓度相关;③不同浓度检测核酸(靶核酸)导致的频率下降绝对值差别不大。结论 SDA压电DNA传感器能直接检测基因组DNA;其响应时间与检测物(靶核酸)的加入量相关,可以用作定量依据。

关键词:压电;DNA;传感器;链置换扩增术;自组装生物膜;结核菌
中图法分类号:R446.5;TP212.3 文献标识码:A

Strand displacement amplification piezoelectric DNA sensor

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

Abstract: **Objective** To construct a strand displacement amplification (SDA)-piezoelectric-DNA-sensor and explore its performance. **Methods** ①A SDA-Piezoelectric-DNA-sensor was established by combining strand displacement amplification (SDA) with piezoelectric-DNA-sensor. ②the performance of the SDA-piezoelectric-DNA-sensor was explored by using *Mycobacterium tuberculosis* genomic fragment IS6110 as detecting target. **Results** ①The signals of the SDA-piezoelectric-DNA-sensors reached about 500 Hz; ② The time with persistent frequency falling of the sensor was dependent on the concentration of the target DNA; ③The signals caused by different concentrations of target DNA had no evident difference. **Conclusion** Pathogen genome DNA can be directly detected with SDA-Piezo-electric-DNA-sensor. The response time is associated with the amount of target DNA. Hence, the SDA-piezoelectric-DNA-sensor may be used to quantitate the target DNA.

Key words: piezoelectricty; DNA; sensors; strand displacement amplification; self-organization; *Mycobacterium tuberculosis*

石英压电DNA传感器是核酸杂交技术与石英质量微天平(QCM)相结合的一种新型DNA传感器[1~3]。在我们课题组前一阶段的研究中发现,石英压电DNA传感器虽然特异性很好,灵敏度也比较高,但由于用作传感器识别元件的核酸探针受空间位阻的影响和长度的限制,难以与基因组DNA发生稳定杂交(另文报道)。为了解决这个问题,本研究将链置换扩增技术(Strand displacement amplifications, SDA)[4]与石英压电DNA传感器技术结合,研制了SDA压电DNA传感器,并研究了其响应特性,证实SDA压电DNA传感器能直接检测基因组DNA。

1 材料与方法

1.1 仪器

压电DNA传感器振荡仪和传感器压电振子(由我室与信息产业部电子第26所研制);频率计数卡(ACL 8454,美国ADLINK公司);BIO-RAD SmartSpec™3000核酸定量仪。

1.2 检测软件

《PESA分析软件V2.0》,运行于Windows98se,本课题组自行开发。

1.3 试剂

结核菌标准菌株(由重庆市肺科医院钟敏女士惠赠);BsoBI、exo-Bst(购自New England Biolabs);SDA引物B1(5′-CAGCCGCCGCGAGG-3′)、B2(5′-AGGGTTAGCCACAC-3′)、S1(5′-CGATTCCGCTCCAGACTTCTCGGGTCGATGGCGAACTCA-3′)、S2(5′-ACCGCATCGAATGCATGTCTCGGGTGGGCACCGTAAACA-3′);检测探针(5′-巯基-TCGATGGCGAACTCA3′)、血液DNA(小量)抽提试剂盒(上海华舜生物工程有限公司)。

1.4 方法

1.4.1 提取并定量稀释结核菌基因组DNA 用华舜基因组抽提试剂盒提取结核菌基因组DNA,按操作说明进行;将提取的结核菌基因组DNA用BIO-RAD SmartSpec™3000核酸定量仪定量以2 mmol/L Tris稀为1 g/L、1 ng/L、1 pg/L、1 fg/L;稀释后的结菌基因组DNA经沸水速冰并在4 ℃冻存。

1.4.2 SDA压电DNA传感器检测系统的建立 SDA压电DNA传感器与振荡仪连结;振荡仪通过数据线与电脑的频率计数卡连结;采用硫醇化合物表面自组装固定技术[5,6]进行探针包被和6-巯基己醇封闭后各加入40 μl SDA混合缓冲液备用;SDA压电DNA传感器在临用前加入100 mmol/L $MgCl_2$ 5 μl、BsoBI 2 μl、exo-Bst 1 μl,在达到振荡平衡后,加入靶基因2 μl进

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:蒋天伦(1972-),男,四川省犍为县人,硕士研究生,主治医师,讲师,主要从事基因传感器方面的研究。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

行检测。

1.4.3　SDA 压电 DNA 传感器的响应模式研究　　用 SDA 压电 DNA 传感器检测 1 μg/L、1 ng/L、1 pg/L 和 1 fg/L 的结核菌基因组 DNA, 观察 SDA 压电 DNA 传感器对不同浓度靶基因的响应情况。

2　结果

在加入 BsoBI 等 SDA 系统组分后, 检测传感器出现比较大的频率波动。在加入结核菌基因组 DNA 后, 每个传感器都出现一个短暂的频率扰动, 然后有一段频率的稳定期, 之后传感器的振荡频率出现持续下降, 下降约 500Hz 后出现短暂的平衡, 然后再次出现持续的频率下降。SDA 压电 DNA 传感器的响应模式有以下特点: ① 不同浓度靶基因导致 SDA 压电 DNA 传感器的频率下降绝对值基本相同, 约为 500Hz; 相同浓度靶基因导致 SDA 压电 DNA 传感器的频率下降的绝对值不完全一致。②加入不同浓度靶基因到 SDA 压电 DNA 传感器出现频率持续下降的时间不同; 加入相同浓度靶基因到 SDA 压电 DNA 传感器出现频率持续下降的时间基本相同, 见图 1。

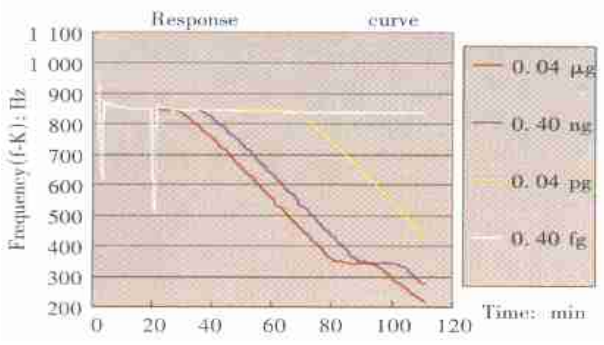


图 1　传感器对不同靶核酸的响应曲线

Fig 1　Response curve of the sensor to different target DNAs

3　讨论

3.1　经典压电传感分析理论和传统压电 DNA 传感器

所有的压电传感分析都建立在 1880 年雅克·居里和皮埃尔·居里兄弟首先发现的石英等晶体的压电现象之上。Sauerbrey[7] 的研究发现压电元件的谐振频率下降与其表面荷载的质量呈负相关关系, 建立了压电传感器的质量分析理论, 为压电传感器的应用奠定了基础。压电 DNA 传感器就是压电传感器在核酸检测中的应用。

3.2　SDA 压电 DNA 传感器及其定量方法

3.2.1　SDA 及其基本原理　　链置换扩增(链替换扩增)是一种酶促核酸体外恒温扩增技术。该技术利用某些限制酶(如 BsoBI、HinC Ⅱ等)能在其半修饰位点形成单链切口的特性、某些聚合酶(如 exo-Bst、exo-Bca)的链置换能力和特殊设计的引物(B1、B2 和 S1、S2)的有序引导来实现核酸的恒温扩增。

3.2.2　SDA 压电 DNA 传感器的工作原理　　SDA 压电 DNA 传感器是核酸等温扩增技术 SDA 与压电 DNA 传感器的有机结合。SDA 压电 DNA 传感器检测系统由 SDA 系统、压电 DNA 传感器芯片、压电振荡仪、频率计数卡和运行《PESA 分析软件 V2.0》的电脑等软硬件组成。系统利用 SDA 反应对原始检测模板进行快速扩增, 生成大量可以与传感器表面的检测探针相结合的单链 DNA 片段, 该片段与固化在传感器表面的检测探针相结合并被延伸为双链 DNA 片段。这一系列反应导致的传感器振荡频率的变化被运行《PESA 分析软件 V2.0》的电脑记录和分析。

我们可以把 SDA 压电 DNA 传感器对靶核酸的响应分为两个阶段。第一阶段, 由于传感器表面的探针存在空间位阻, 无法与液相的引物 S1 竞争 SDA 扩增产生的单链片段而没有响应, 即不出现频率下降。该阶段直到 S1 探针被耗尽(或少到不能与传感器探针竞争的程度)。很显然, 这个过程的速度与 S1 的含量和消耗速度有关, 其消耗速度与靶核酸的初始浓度有关。在第二阶段, 由于 S1 已经耗尽, 由 S2 扩增子形成的单链 DNA 出现堆积并克服空间位阻的影响与传感器表面探针杂交并被延伸而导致传感器开始出现频率下降。此时, 由于引物 S1 耗尽而 S2 引物还大大富余, 使以 S2 为扩增端的扩增子(Amplicon)呈线形增加, 因此产生的能与传感器上探针杂交的单链 DNA 也呈线形增加, 所以传感器在出现一定频率下降后的一段时间内出现线性下降。当传感器的探针被耗尽时, 传感器的频率出现一段平台期。但由于 SDA 反应还一直在进行, 大量 SDA 产物的堆积导致反应体系的粘度逐渐增加, 粘度增加达到一定程度就会对传感器发生影响, 导致传感器的频率持续下降直至 SDA 反应终止和溶液的粘度等条件达到平衡。

3.2.3　SDA 压电 DNA 传感器依赖响应时间的定量方法　　我们在实验中发现, 不同浓度靶基因导致 SDA 压电 DNA 传感器的频率下降绝对值基本相同, 无法利用质——频关系进行核酸定量分析; 而 SDA 压电 DNA 传感器的响应时间则与靶核酸的浓度相关, 这提示我们可以用响应时间 $\triangle T$ 作为靶核酸定量的基础。

从我们对 SDA 压电传感器对靶核酸响应过程的分析可知, SDA 压电 DNA 传感器的响应时间其实就是 SDA 反应中引物 S1 的耗尽时间。S1 的耗尽时间与 SDA 系统中 S1 的含量 M、SDA 完成一次反应循环的时间 t_0、和初始靶核酸的含量 y 有关。因为 SDA 反应对引物 S1 的需要具有累加的特性, 即在第 i 次 SDA 循环所中消耗的引物 S1 的量与 i 的函数 f_i 满足:

$$\begin{cases} f_1 = y \\ f_2 = y \\ f_3 = 2y \\ f_i = f_{(i-1)} + f_{(i-2)};\ (i \geqslant 3) \end{cases}$$

设在进行第 i 次 SDA 循环后 SDA 引物 S1 刚好耗尽, 则有

$$M = f_1 + f_2 + f_3 + \cdots + f_{(i)} = (2f_{(i-1)} + f_{(i-2)} - 1) \cdot y$$

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

由于 $f_{(i)}=f_{(i-1)}+f_{(i-2)}$ 是斐波拉契数，所以：

$$f_{(i)}=\frac{y}{5}\left(\frac{1+\sqrt{5}}{2}\right)^{i}-\frac{y}{5}\left(\frac{1-\sqrt{5}}{2}\right)^{i}$$

令 $x=\Delta T$，经过数学推导得到：

$$\begin{cases}\text{当 } \Delta T/T_0\leqslant 2 \text{ 时，} y\geqslant M\\ \text{当 } \Delta T/t_0\geqslant 3 \text{ 时，} y=\dfrac{M}{a\cdot b^{x}-c\cdot d^{x}-1}\\ (a、b、c \text{ 和 } d \text{ 为常数})\end{cases}$$

在推导以上函数关系式时假设每个靶基因片段拷贝形成一个 SDA 扩增子，如果考虑靶基因片段拷贝形成 SDA 扩增子的产率和从靶基因片段形成 SDA 扩增子的时间，以上公式应该修正为：经数学整理，可得：

$$\begin{cases}\text{当 } \Delta T/T_0\leqslant 2 \text{ 时，} y\geqslant M\\ \text{当 } \Delta T/t_0\geqslant 3 \text{ 时，} y=k\dfrac{M}{a\cdot b^{x-T0}-c\cdot d^{x-T0}-1}\\ (a、b、c、d、k \text{ 和 } T0 \text{ 为常数})\end{cases}$$

经数学整理，可得：

$$\begin{cases}\text{当 } \Delta T/T_0\leqslant 2 \text{ 时，} y\geqslant M\\ \text{当 } \Delta T/t_0\geqslant 3 \text{ 时，} y=k\dfrac{M}{a_1\cdot b_1^{x}-c_1\cdot d_1^{x}-1}\end{cases}$$

a_1、b_1、c_1、d_1 和 k 为常数，因 SDA 体系的不同而不同。对不同的 SDA 体系，应该用实验确定。由公式可见，传感器的响应时间 ΔT 和靶核酸含量成一元函数关系。在实际使用中，由于 a_1、b_1、c_1、d_1 和 k 的测定很复杂，根据相同反应条件（反应体系、温度）a_1、b_1、c_1、d_1 和 k 相同的原理，对于同一批 SDA 试剂，可以制作标准曲线用于定量。

3.3 SDA 压电 DNA 传感器能直接快速检测基因组 DNA

由于空间位阻的影响和短探针杂交结合力的限制，传统压电 DNA 传感器难以直接快速检测基因组 DNA，这个问题在 SDA 压电 DNA 传感器得到解决。在 SDA 压电 DNA 传感检测中，SDA 反应和压电 DNA 传感器的检测是一个有机的过程，完全可以看成一步反应，即 SDA 压电 DNA 传感器对加入的检测目的基因的响应。从这种意义上说，SDA 压电 DNA 传感器实现了人们对直接快速检测基因组 DNA 的期望。

3.4 SDA 压电 DNA 传感器解决了质——频分析的不足

由于压电 DNA 传感器工作在液相，导致传感器频率下降的因素除了 DNA 杂交导致的质量负载外，还有液体的电导率（离子浓度）、pH、粘度等理化因素。这使得压电 DNA 传感器不能使用基于纯质量负载为推导前提的 Sauerbrey 方程来进行质量分析。另外，由于不同传感器对同一质量负载的响应不完全一致，传感器不能百分之百再生等原因，使得使用基于质——频效应的校正曲线和标定方法缺乏很好的理论基础。

SDA 压电 DNA 传感器完全不依赖质量负载与压电传感器频率下降值与质量负载的关系，而使用与 SDA 反应速度（该速度由靶基因的拷贝数决定）相关的传感器响应时间为定量分析基础，对于同一批 SDA 试剂和反应条件来说，ΔT 和靶核酸含量有稳定的变化规律。因而完全避开了液相条件对传感器频率的影响和不同传感器对相同靶核酸的响应差异问题。

3.5 SDA 压电 DNA 传感器提高了检测的灵敏度

由于采用了 SDA 核酸扩增技术，SDA 压电 DNA 传感器的灵敏度比压电 DNA 传感器提高了两个数量级。在本实验中成功实现了对 0.04pg/L 的结核菌基因组 DNA 的检测。

通过调节 S1 的浓度，可以调节 SDA 压电 DNA 传感器的灵敏度。增加 S1 的含量有助于提高 SDA 的扩增率，但同时使 S1 的耗竭时间延长，不利于快速检测；减少 S1 的含量可以加快检测速度，但将引起 SDA 的扩增率降低，使得 SDA 压电 DNA 传感器的最低检出限升高，甚至失去对基因组 DNA 的响应。我们采用的 S1 浓度为 100 nmol/L，在其他情况，可能需要进一步探索。

3.6 SDA 压电 DNA 传感器目前存在的问题

3.6.1 制作工艺有待进一步探索和改进 尽管 SDA 压电 DNA 传感器对不同传感器的称重差异要求不大，但压电传感器的稳定性仍然对 SDA 压电 DNA 传感器的性能有重大影响。稳定性问题的解决，有赖于制作工艺的进一步提高。

3.6.2 通量不足 SDA 压电 DNA 传感器由于链延伸反应的存在，只能一次性使用，因而不可能象化学传感器那样难以对样本实现流动检测。加上生物化学反应的速度问题，单个 SDA 压电 DNA 传感器难以适应大样本与多指标的要求。对于这个问题，我们采用传感器集成技术——SDA 压电 DNA 传感器阵列来解决（另文报道）。

参考文献：

[1] Okahata Y, Niikura K. DNA sensor by using a quartz-crystal microbalance [J]. Tanpakushitsu-Kakusan-Koso, 1995, 40(2): 165－172.

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

[3] Janshoff A, Galla H J, Steinem C. Piezoelectric Mass-Sensing Devices as Biosensors-An Alternative to Optical Biosensors[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2000, 39(22): 4 004－4 032.

[4] Spargo C A, Fraiser M S, Van Cleve M, *et al*. Detection of M. tuberculosis DNA using thermophilic strand displacement amplification[J]. Mol Cell Probes, 1996, 10(4): 247－256.

[5] Wang J, Nielsen P E, Jiang M, *et al*. Mismatch-sensitive hybridization detection by peptide nucleic acids immobilized on a quartz crystal microbalance [J]. Anal Chem, 1997, 69(24): 5 200－5 202.

[6] Okahata Y, Masunaga Y, Matsuno H, *et al*. Quantitative detection of a DNA ligase reaction on a quartz-crystal microbalance[J]. Nucleic Acids Symp, 1999, (42): 147－148.

[7] Sauerbrey G. Use of vibrating quartz for thin film weighing and microweighing[J]. Z Phys, 1959, 155(2): 206－209.

（编辑 王 红）

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