DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.01.011
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)01-0023-03

论著

链延伸反应提高压电基因传感器的灵敏度的实验研究

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

提 要:目的 利用链延伸反应的原理延长引物链以提高压电基因传感器表面的质量负载,从而提高传感器的灵敏度。方法 基因传感器阵列表面分别固定上金黄色葡萄球菌mecA及femA两种探针片段,待杂交上相应的靶序列片段后,加入Klenow酶,室温下(20 ℃左右)进行链延伸反应8 h。结果 50 nmol/L单链mecA在杂交反应及链延伸反应的过程中,频率的下降值分别为(99.2±8.5)Hz、(192.9±13.3)Hz。而femA则分别下降了(142.4±11.2)Hz、(222.6±16.6)Hz。mecA、femA在链延伸反应前的检测灵敏度为0.5 nmol/L,但经链延伸反应后检测灵敏度提高到了0.05 nmol/L。结论 链延伸反应有效地提高了压电基因传感器的灵敏度,可用于微量DNA的检测、核酸同源性分析等方面。

关键词:基因传感器;金黄色葡萄球菌;DNA;灵敏度
中图法分类号:R394;R446.5;TP212.3 文献标识码:A

Sensitivity improvement of piezoelectric gene sensor by strand extension reaction

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

Abstract: **Objective** To improve the sensitivity of piezoelectric gene sensor by increasing its surface load on the basis of the principle of strand extension reaction. **Methods** mecA and femA probes of *Staphylococcus aureus* were immobilized seperately on the surface of gene sensor array. Klenow large fragment was added to extend the strand for 8 h in room temperature after the probes were hybridized with corresponding target DNA. **Results** The frequencies of the gene sensor were reduced by (99.2±8.5) Hz and (192.9±13.3) Hz during the hybridization and extension reaction respectively, when 50 nmol/L single strand mecA was added on the surface of the gene sensor array, while (142.4±11.2) Hz and (222.6±16.6) Hz for the femA. Before the strand extension reaction, the sensitivity of the gene sensor array was 0.5 nmol/L, and was improved to 0.05 nmol/L after the reaction. **Conclusion** The sensitivity of piezoelectric gene sensor array is significantly improved by strand extension reaction. This method can be used in the detection of trace DNA and the analysis of homogeneity of nucleic acid.

Key words: sensor; *Staphylococcus aureus*; DNA; sensitivity

近年来,由耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin-resistant staphylococci aureus, MRSA)造成的感染已成为临床上日益严重的一个问题。在我国,文献[1]报道表明由MRSA造成的感染率已高达52.4%,现研究明确了葡萄球菌对甲氧西林耐药的一个主要原因是由于其大量产生的一种青霉素结合蛋白——PBP2a[2],而mecA基因正是PBP2a的编码基因,因此可以将mecA基因作为MRSA诊断的分子标志[3]。而femA作为金葡菌特有的基因,可作为患者是否有金葡菌感染的一个分子标志。本研究利用压电基因传感器在晶体表面发生微小的质量变化时,其频率就会发生较大的变化的特性,通过固定在传感器上的mecA及femA探针检测相应的靶序列,并且在杂交反应完成后,利用模板-引物杂交后的引物链延伸反应的原理,以固定的探针为引物,杂交上的单链靶序列为模板,用klenow酶延伸杂交反应后的引物链以提高石英晶振表面的质量负载,从而提高传感器的灵敏度。

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

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 压电传感器阵列(Piezoelectric sensor array, 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。

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

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

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 SK251 基因组 DNA 小量抽提试剂盒购自上海生物工程公司。引物及探针设计：扩增金黄色葡萄球菌 mecA 基因 379 bp 片段的上游引物：5′ TAATGGGACCAACATAACC 下游引物：5′ CCAGGAATGCAGAAAGACC。探针 1 序列为：5′ SH-$(CH_2)_6$-CCAGGAATGCAGAAAGACC。扩增金黄色葡萄球菌 femA 基因 654 bp 片段的上游引物：5′ TGTAAAGGCACCAAACTC 下游引物：5′ GTATCCCATGCGGAAGGC。探针 2 序列为：5′ SH-$(CH_2)_6$-TGGCATTGTCATTGGTAGCG。均合成自上海生物工程公司。6-巯基己醇购自 Sigma 公司。其余常规试剂均为分析纯级。

1.1.5 菌株 标准耐甲氧西林金葡菌菌株 ATCC^R 43300 由本室提供，结核菌标准菌株由重庆市肺科医院钟敏女士惠赠。

1.1.6 仪器 PCR 扩增仪为 PE 公司的 GeneAmp 2400 型，核酸定量仪为 BIO-RAD SmartSpec™ 3000 型。

1.2 实验方法

1.2.1 金葡菌、结核菌基因组 DNA 的提取如试剂盒说明书进行。mecA、femA 片段的 PCR 扩增条件如下：抽提的基因组 DNA 200 ng 为模板，上、下游引物各约 20 pmol，94 ℃ 0.5 min，50 ℃ 0.5 min，72 ℃ 1.5 min，30 个循环。产物经纯化后定量。

1.2.2 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。

1.2.3 探针 1 和 2 的固定 2×5 型石英晶体传感器微阵列与振荡电路相接后，先在气相中稳定 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，1～5 号池统一固定上终浓度为 1.0 μmol/L 探针 1，6～10 号池则统一固定上同样终浓度的探针 2。观察 2 h 后加入 1.0 mmol/L 的 6-巯基己醇 10 μl 封闭 1 h。记录频率的变化，然后吸净液体并以去离子水清洗 3 遍，氮气吹干。

1.2.4 杂交反应的进行 在上述检测池中重新加入 Tris-HCl 缓冲液（含 0.2 mol/L NaCl）90 μl，频率稳定后 1～3 号池加入终浓度为 50 nmol/L 热变性后的单链 mecA PCR 扩增产物，6～8 号池则加入 50 nmol/L 的单链 femA PCR 扩增产物，4 号及 9 号池加入 50 nmol/L 热变性后的单链结核菌基因组 DNA 作探针特异性实验，5 号及 10 号池则加入 Tris-HCl 缓冲液作为空白对照，室温下（20℃左右）杂交反应 2 h，记录频率的变化。实验重复 4 次以取平均值。

1.2.5 链延伸反应的进行 杂交反应结束后，直接往检测池中加入 25 mmol/L 的 $MgCl_2$ 20 μl，10 mmol/L dNTP 2 μl，Klenow 酶 1 μl。室温下（20 ℃左右）反应 8 h，记录频率的变化。实验重复 4 次以取平均值。

1.2.6 传感器灵敏度的测定 将 PCR 反应后的 mecA 和 femA 扩增产物分别 5 倍比稀释成 1、0.5、0.1、0.05 nmol/L 4 种浓度梯度，按上述操作步骤分别加在 1～4 号池，6～9 号池上。5 号、10 号池仍分别作为空白对照池。与固定的探针 1 及 2 进行杂交反应后再进行链延伸反应，室温下反应 8 h，分别记录频率的变化。实验重复 7 次以取平均值。

1.3 统计学处理

采用 t 检验。

2 结果

mecA 及 femA 按预期的结果分别 PCR 扩增出了 379 bp 及 654 bp 的片段。

50 nmol/L 单链 mecA 在杂交反应及链延伸反应的过程中，频率的下降值分别为（99.2±8.5）Hz、（192.9±13.3）Hz。而 femA 则分别下降了（142.4±11.2）Hz、（222.6±16.6）Hz。4 号及 9 号池的结核菌 DNA 在杂交反应中频率下降在 10Hz 以内，但加 klenow 酶后降了（107.8±9.4）Hz。5 号及 10 号池的空白对照在杂交反应中未见频率的下降，但在加 klenow 酶链延伸反应后也降了（100.6±9.2）Hz。

传感器灵敏度实验的结果见表 1，可见链延伸反应前传感器只能检测到 0.5 nmol/L 的 mecA 及 femA 靶序列浓度，而链延伸反应后检测限提高到 0.05 nmol/L（表中所列的频率下降值均为减去了空白对照的 100.6Hz 后所得到的）。

表 1 不同靶序列浓度下的传感器灵敏度实验结果（$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 Results of sensitivity of the sensor at different concentrations of target DNA（$\bar{x}\pm s$）

Concentration of target (nmol/L)	△f for mecA reaction (Hz)		△f for femA reaction (Hz)	
	Hybridization	Strand extension	Hybridization	Strand extension
0.05	——	10.9±1.7	——	15.1±1.9
0.1	——	19.9±2.1	——	30.6±2.9
0.5	17.9±1.6	35.1±3.1**	28.0±2.4	48.3±3.8**
1.0	25.1±2.5	50.3±4.3**	39.3±3.5	64.6±5.7**

△f: Decrease of frequency; **: $P<0.01$ *vs* Hybridization group

3 讨论

生物传感器由于其操作简便、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[4～6]。我们所研究的压电基因传感器是利用石英晶体的压电效应来是实现能量转换和传感的。与其它基因传感器相比，压电基因传感器具有成本低廉，操作简便等优势，但同时其检测灵敏度仍有待进一步提高。Sauerbrey[7] 推导出晶体表面的质量变化（Δm）与晶体谐振频率的变化（Δf）存在着简单的线性函数关系：$\Delta f=-K\Delta m$。该方程式也是石英谐振式传感器工作的理论基础：通过检测的频率的变化反映晶体表面微小的质量变化。本研究利用引物-模板杂交后的链延伸反应的原理，力图提高基因传感器的灵敏度。我们同时对 mecA 及 femA 进行了检测，这样可同时判定患者是否感染上了金葡菌以及金葡菌是否为 MRSA，为临床上 MRSA 的诊断和治疗提供分子水平的依据。

链延伸反应后传感器检测灵敏度的提高：从实验结果可以看出，仅仅依靠单纯的杂交反应，传感器仅能检测到 0.5 nmol/L 的 mecA 及 femA 序列，而在经过链延伸反应后，检测灵敏度提高了 10 倍，至 0.05 nmol/L。尤其当靶序列浓度较低时，链延伸的效应表现得更为明显，从表 1 可以看出，延伸反应后频率下降值提高了一倍左右（与链延伸前相比，P 值均<0.01）。这对检测临床上低浓度的靶序列非常有利。另外，探针与结核菌 DNA 并不发生反应，这反映出探针的高度特异性。

klenow 酶的粘度对链延伸反应的影响：石英晶振传感器除了对表面的质量负载极为敏感之外，同时还对其表面覆盖的液体粘度的变化也较为敏感，我们曾专门探讨了液体粘度对传感器的影响并利用这种非质

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

量效应的原理，设计了检测临床上凝血酶原时间的实验(另文发表)，由于 klenow 酶是保存在高浓度的甘油缓冲液中，因此其粘度对传感器的影响不可忽视，实验中我们专门设置了空白对照以消除粘度的影响。

温度对链延伸反应的影响：本实验之所以采用 klenow 酶，主要是因为没有一个恒定而有效的控温电路。而 klenow 酶适用的反应温度较低，在 5～37 ℃的范围内都有较强的延伸效力。但在室温下(20 ℃左右)延伸，毕竟存在着反应速度较慢的问题，这也是我们选择反应连续进行 8 h 的原因。后续的实验研究我们计划在检测电路上增设一控温电路，使检测池的温度可恒定在 37 ℃，这样使 klenow 酶的效力能充分发挥，缩短反应时间。甚至可以让检测池的温度恒定在 72 ℃，这样就可以利用 Taq 酶进行链延伸反应，更加加快了检测进程。这方面的工作正在进行中。

探针及靶序列的长度的影响：前期实验研究发现当固定 20 碱基左右的短链探针，靶序列的长度为 20～108 碱基时，其频率下降值与碱基数呈线性关系。进一步研究发现，靶序列长度范围在 108～654 碱基之间时，传感器的频率下降值与碱基数也呈另一种线性关系，只不过其斜率不同(有关数据另文发表)。另外，长链探针(直接以不对称 PCR 的反应产物为探针)的固定，以及检测靶序列为整个病原体基因组的研究工作现正在进行中。

总之，利用引物-模板杂交后链延伸反应的原理，我们有效地提高了压电基因传感器阵列的灵敏度，使临床上痕量 DNA 的检测成为可能。该法也可用于核酸同源性分析等方面。

参考文献：

[1] 周惠平. 临床细菌学检验面临的挑战[J]. 中华医学检验杂志, 1999, 22(1): 12－14.
[2] Chambers H F. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications[J]. Clin Microbiol Rev, 1997, 10(4): 781－791.
[3] de Lencastre H, de Jonge B L, Matthews P R, *et al*. Molecular aspects of methicillin resistance in staphylococcus aureus[J]. J Antimicrob Chemother, 1994, 33(1): 7－24.
[4] Vaezi-Nejad S M. A random walk in sensors, recent advances and market opportunities[J]. Measurement and Control, 1998, 31(1): 80－85.
[5] Minunni M, Tombelli S, Mariotti E, *et al*. Biosensors as new analytical tool for detection of Genetically Modified Organisms (GMOs)[J]. Fresenius J Anal Chem, 2001, 369(7－8): 589－593.
[6] Marrazza G, Tombelli S, Mascini M, *et al*. Detection of human apolipoprotein E genotypes by DNA biosensors coupled with PCR[J]. Clin Chim Acta, 2001, 307(1－2): 241－248.
[7] Sauerbrey G. Use of vibrating quartz for thin film weighing and microweighing[J]. Z Phys, 1959, 155(2): 206－222.

(编辑 王 红)

文章编号：1000-5404(2002)01-0025-01

个案与短篇

术前选择性门静脉栓塞治疗肝癌的护理体会

Nursing experience of patients with primary hepatocellular carcinoma treated with preoperative selective portal vein embolization

范 雨 (第三军医大学附属西南医院全军肝胆外科研究所、西南肝胆外科医院，重庆 400038)

原发性肝癌是一种常见的消化系统肿瘤，手术切除是肝癌患者首选的治疗措施，但仍有相当部分患者因肿瘤巨大而失去手术机会；另一方面，广泛的肝切除会导致患者出现严重的肝功能不全、出血、感染等严重并发症，进而增加手术的死亡率。术前选择性门静脉栓塞(Preoperative selective portal vein embolization, POSPVE)是近年来才兴起的肝癌治疗方法，其能使栓塞侧肝组织血流量减少，对侧增多，促进对侧肝脏细胞增生，预留肝体积(Future remaining liver volum, FRLV)增大，进而扩大了肝癌肝切除的指征，提高了手术的安全性[1,2]。我科 2000 年 10 月至 2001 年 4 月对 26 例失去手术机会的原发性肝癌患者进行 POSPVE 治疗，现将护理体会报告如下。

1 材料和方法

临床资料：26 例不宜完成手术切除的原发性肝癌患者，其中，男 21 例，女 5 例，年龄 32～71 岁，平均 46.5 岁，合并肝硬化者 4 例，肿瘤部位位于右肝者 24 例，左肝者 2 例，肝功能 Child-Pugh 分级 A 级者 7 例，B 级 19 例。24 例患者成功进行了 POSPVE 治疗，2 例失败(其中 1 例因肿瘤压迫右侧门静脉，导致其明显变细导致手术失败；另一例患者因难以忍受栓塞剂刺激而终止手术)。

方法：采用在 B 超引导下经皮经肝细针门静脉分支穿刺法，先通过 B 超确定拟穿刺的门静脉分支，用 5%利多卡因局部麻醉至肝包膜，在 B 超引导下用 21G 肝穿刺针由探头侧方进针，进入一侧门静脉的分支后，拔出针芯，缓慢按 0.4 ml/kg 体重注入栓塞剂，栓塞剂由无水乙醇、碘油按 1∶2 比例配制。

2 护理

术前护理：大多数患者对 POSPVE 缺乏了解，可能对手术效果抱有过高的不切实际的期望，也易产生恐惧、怀疑心理，因此，正确掌握患者及其家属的的心理，争取其最大限度的理解和配合，是确保手术得以顺利进行的关键。我们的主要做法

(下转 31 页)

作者简介：范 雨(1972－)，女，重庆市丰都县人，护师，主要从事肝胆外科临床护理方面的研究。电话：(023)68753781

收稿日期：2001-01-05；修回日期：2001-06-21

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