DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.01.014
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)01-0029-03

论著

链置换扩增(SDA)压电DNA传感器阵列

蒋天伦[1],府伟灵[1],张 波[1],刘明华[1],陈 鸣[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SDA压电DNA传感器阵列,解决SDA压电DNA传感器的检测通量不足问题。方法 ①采用传感器集成技术将10个SDA压电DNA传感器制成2×5的传感器阵列芯片;②以结核菌IS6110片段为检测对象,研究SDA压电DNA传感器阵列的特性。结果 传感器阵列芯片的各传感器微单元能够相互独立工作,互不干扰。结论 SDA压电DNA传感器的阵列化不影响传感器性能,同时在一定程度上提高了SDA压电DNA传感器的检测通量,使SDA压电DNA传感技术更具临床实用性。

关键词:压电;传感器;链置换扩增;阵列;DNA
中图法分类号:R318;TP212.3 文献标识码:A

Increase of detection throughput of strand displacement amplification piezoelectric DNA sensors array

JIANG Tian-lun, FU Wei-ling, ZHANG Bo, LIU Ming-hua, CHEN Ming, 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 array with increased detection throughput. Methods Ten SDA-piezoelectric-DNA-sensors were composed to build a SDA-piezoelectric-DNA-sensor array (2× 5) on a chip. The performance of SDA-piezoelectric- DNA-sensor array was explored to detect *Mycobacterium tuberculosis* genomic fragment IS6110. Results Every micro sensor unit on the chip worked independently and had no interference with each other. Conclusion It is confirmed that SDA-piezoelectric-DNA-sensor array can improve the detection throughput of SDA-piezoelectric-DNA-sensor in some degree with the sensor's performance intact.

Key words: piezoelectricity; DNA; sensors; strand displacement amplification; array

在前一阶段的研究中,我们建立了链置换扩增(SDA)压电DNA传感器技术,解决了压电DNA传感器在液相直接检测基因组DNA所遇到的几个主要障碍,但其检测通量仍然不能满足实用化的需要(另文报道)。为了解决这个问题,我们采用传感器集成思路,将10个SDA压电DNA传感器集成在一张芯片上制成了2×5的SDA压电DNA传感器阵列,并研究了阵列化对SDA压电DNA传感器阵列内各微单元性能的影响。

1 材料与方法

1.1 仪器

压电DNA传感器阵列振荡仪-实验型、2×5传感器阵列(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。由本课题组自行开发。

1.3 关键试剂

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′-CAGCCGCCGCGAGC-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 提取结核菌基因组DNA用华舜基因组抽提试剂盒,按操作说明进行;将提取的结核菌基因组DNA用BIO-RAD SmartSpec™ 3000核酸定量仪定量后以2.0 mmol/L Tris稀释为1 μg/L、1 ng/L、1 pg/L、1 fg/L;稀释后的结核菌基因组DNA经沸水浴后迅速冰浴并在4 ℃冻存。

1.4.2 SDA压电DNA传感器检测系统的建立 如图1所示,传感器阵列的各压电晶片均采用10 MHz AT切型的石英基片,用离子溅射镀钛-金膜工艺制作。制作的晶振用抗粘胶实验检验金属膜与石英基片粘合牢固后,测定每片的基频与插入损耗,选择插入损耗小于5 db且基频差异小于1 KHz的10个晶振用环氧树脂粘于PCB板上,制成含2×5个传感器微单元的压电传感器阵列芯片,由25针D型头引出电极线用于连接阵列振荡仪。各晶振单元相互独立,每传感器单元容积均为150 μl。采用硫醇化合物表面自组装固定技术[1~5]对1~9号传

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

感器微单元进行探针包被，1～10 号传感器微单元都用 6-巯基己醇封闭。最后各加入 40μl SDA 混合缓冲液备用。组建 SDA 压电 DNA 传感器检测系统：SDA 压电 DNA 传感器阵列芯片与振荡仪连结，阵列振荡仪提供 10 个振荡电路对阵列内各传感器微单元一一对应振荡；振荡仪通过数据线与电脑的频率计数卡连结。SDA 压电 DNA 传感器阵列在临用前向各传感器单元内加入 100 mmol/L $MgCl_2$ 5μl、BsoBI 2μl、exo-Bst 1μl，在达到振荡平衡后，加入靶基因 2μl 进行检测。



图 1 SDA 压电 DNA 传感器阵列芯片

Fig 1 A SDA-piezoelectric-DNA-sensor array

1.4.3 阵列化对阵列内各传感器单元性能影响的研究 将阵列内一个传感器微单元先进行检测，然后在检测的各阶段逐渐将其邻近的微单元通电起振，观察当其他传感器起振后对先进行检测作业的传感器的影响，以及先进行检测的传感器微单元的 SDA 可能对邻近传感器单元造成污染的情况。

1.4.4 SDA 压电 DNA 传感器阵列内差异实验 SDA 压电 DNA 传感器阵列内各传感器微单元同时对同一浓度的结核菌基因组 DNA 进行检测，观察各传感器的响应差异。重复不同浓度靶核酸实验。

2 结果

2.1 阵列化对阵列内各传感器单元的影响

如图 2 所示：①首先用 1＃传感器进行检测时，其扩增未对后续进行检测的邻近传感器单元 2＃、6＃和 7＃的的检测造成污染；②1＃传感器在进行检测时未受后续邻近传感器单元起振带来的声电冲击影响。

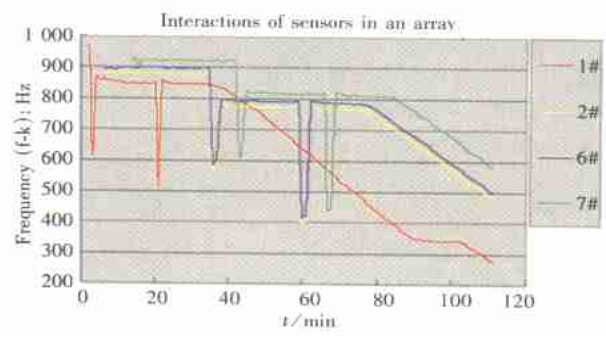


图 2 SDA 压电 DNA 传感器阵列内各传感器单元间的相互影响

Fig 2 Interaction among the sensors in a SDA-piezoelectric-DNA-sensor array

2.2 SDA 压电 DNA 传感器阵列内差异

图 3 为 SDA 压电 DNA 传感器阵列内 7＃、8＃、9＃和 10＃传感器同时检测 0.04 ng/L 结核菌基因组时，传感器单元的响应情况。可见传感器阵列内各检测单元的响应曲线完全一致，说明阵列内各传感器单元具有相同响应规律；也可以看见：①7＃、8＃、9＃和 10＃传感器单元的基频存在差异；②7＃、8＃和 9＃传感器单元的频率下降绝对值有差异；③7＃、8＃和 9＃传感器单元的响应时间基本相同；④7＃、8＃和 9＃传感器单元出现频率下降后，下降的速率基本相同；⑤10＃传感器（参考传感器）没有第一次频率下降，第二次下降出现的时间比检测传感器早。

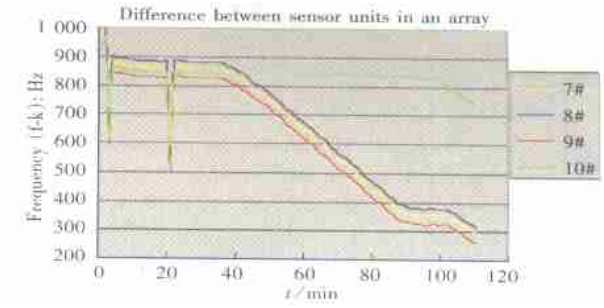


图 3 SDA 压电 DNA 传感器阵列内传感器单元间差异

Fig 3 Differences among the sensors in a SDA-piezoelectric-DNA-sensor array

3 讨论

3.1 SDA 压电 DNA 传感器的集成和阵列化不影响传感器的性能

在我们的实验中发现阵列内的任意传感器都可以作为独立传感器工作，相继和同时进行检测的传感器之间没有频率的干扰现象。这得益于我们这套实验方案的设计。在本研究中，我们的传感器阵列芯片由独立的 10 个传感器粘贴在一张 PCB 板上制成，由 PCB 板和传感器晶片共同形成 10 个传感器微单元；振荡仪对传感器阵列的 10 个传感器微单元分别提供振荡。因此，在本方案中，从阵列内传感器的压电晶片到振荡电路都完全相互独立，没有电磁与声学干扰。在传感器阵列的任意微单元上进行的 SDA 反应都没有对阵列内的其他传感器造成污染，这与我们在每个传感器微单元上加入的石蜡油将 SDA 体系进行了相互隔离有关。

3.2 SDA 压电 DNA 传感器阵列化在一定程度上解决了检测通量的问题

我们在本实验中成功制作了集成有 10 个传感器微单元的 SDA 压电 DNA 传感器阵列芯片，扣除用作系统对照的一个微单元，还能同时提供 9 个测试传感器。只要改变 SDA 压电 DNA 传感器阵列芯片内不同传感器微单元的探针，完全可以利用我们的检测系统实现单样本多指标（不大于 9 个）或多样本多指标（样本数与指标数的乘积不大于 9）的检测。这样的检测通量已经能够满足大中型医院的急诊检测需要。这说明我们的 SDA 压电 DNA 传感器阵列芯片已经在一定程度上解决了 SDA 压电 DNA 传感器的检测通量不足的问题。提供了 SDA 压电 DNA 传感器走出实验室的产品模式。

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

3.3　SDA 压电 DNA 传感器阵列目前存在的问题

3.3.1　集成度需要进一步提高　　本实验在设计时为了防止阵列内各传感器微单元间的电、声干扰而采用了阵列内传感器微单元、振荡电路以及检测电路都是一一对应的独立工作模式。实验发现阵列中的每个传感器完全独立工作, 几乎没有相互影响。但这种方案的最大缺点就是随阵列芯片的集成度增加, 制作难度和制作成本同时增加。要大规模提高芯片的集成度, 有赖于阵列化思路的改变, 如采用微电子工艺在一张石英基片上进行多个传感器集成的方案和采用开关电路切换振荡的电路方案。

3.3.2　抗污染问题　　由于压电 DNA 传感器的液相面不能密封, 这使得 SDA 压电 DNA 传感器阵列内各传感器检测单元间很容易导致交叉污染。这种交叉污染在进行多样本单指标检测时更容易出现, 危害也最大。对于这个问题, 采用了两种措施来加以防止: 一是用 dUTP 取代 dTTP, 利用 uracil-DNA glycosylase 来破坏污染的扩增子[6]; 二是在阵列的每个传感器微单元上都覆盖少量无菌石蜡油, 将每个传感器微单元的 SDA 反应体系都与空气隔开, 这在一定程度上起到了防止或降低污染的效果。尽管我们采取的防污染措施在实验中被证明效果良好, 但进一步研究和探索更好的防污染方案仍然很有必要。

在以上实验中, 我们成功地制作了 2×5 的 SDA 压电 DNA 传感器阵列, 研究结果表明, SDA 压电 DNA 传感器的阵列化在不影响阵列内传感器单元的性能, 大幅提高了 SDA 压电 DNA 传感器的检测通量, 使 SDA 压电 DNA 传感器的研究在实用化方向上向前迈出了一步。

参考文献:

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

[2] 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.

[3] 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.

[4] Chrisey L A, Lee GU and O'Ferrall CE. Covalent attachment of synthetic DNA to self-assembled monolayer films[J]. Nucleic Acids Res, 1996, 24(15): 3 031—3 039.

[5] Patrick J S, Cooks R G, Pachuta S J. Analysis of nucleotides and oligonucleotides immobilized as self-assembled monolayers by static secondary ion mass spectrometry[J]. Biol Mass Spectrom, 1994, 23(11): 653—659.

[6] 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.

（编辑　王　红）

（上接 25 页）

是: ①耐心细致地向患者及家属讲解手术经过, 积极宣讲手术可能对其带来的益处以及国外目前开展此项手术的现状, 以消除患者的恐惧心理, 增强患者的信心。②完善各项常规检查如: 出、凝血时间、肝肾功能、心电图、胸部摄片等, 以充分了解患者的全身健康状况, 做到心中有数, 一旦术中及术后出现异常情况, 能做到有的放矢。③认真做好术前准备, 包括: 碘过敏试验, 对于较紧张的患者手术前 1 d 晚上可给予适量镇静剂以利于患者较好地休息; 术前 30 min 分别肌肉注射胃复安 10 mg、杜冷丁 100 mg、安定 10 mg 以及非那根 25 mg。

出血倾向的观察和预防: 肝癌患者因肝脏合成凝血因子的功能降低, 容易出现出、凝血功能障碍, 术后应加压包扎穿刺点, 在穿刺部位放置冰袋, 并注意观察穿刺部位渗血情况。患者应绝对卧床至少 6 h, 每 1h 测量血压、脉搏一次 12～24 h。

胃肠道反应的护理: 本组患者中 18 例出现胃肠道反应, 发生率为 75.0%, 其中肝功能 Child-Pugh 分级为 B 级患者的发生率为 77.8%(14/18), 而 A 级患者的发生率为 66.7%(4/6)说明肝功能低下是患者发生胃肠道反应的重要因素之一, 另外, 栓塞剂的副作用也是患者出现胃肠道反应的重要因素。大部分患者仅出现较轻的反应如: 纳差、恶心等, 少数患者出现频繁呕吐, 但 2～5 d 后都可以自行缓解。对反应较重的患者可予肌肉注射胃复安或枢复宁。应鼓励患者进食高能量、高蛋白、富含维生素且易消化的饮食, 以补充机体消耗。

肝区疼痛的护理: 肝区疼痛不适是 POSPVE 术后患者最常见的反应, 本组全部手术成功患者均出现此不良反应, 可能与多数患者术前已存在肝区疼痛, 术后因栓塞引起同侧肝脏的轻度无菌性炎症、少量坏死而加重疼痛。此时, 患者易出现紧张、焦虑等, 可适当应用镇痛剂如消炎痛, 但应慎用镇静剂, 以防止诱发肝性脑病。护理上应多向患者解释, 以缓解其紧张情绪, 分散患者的注意力等。

发热的护理: 本组患者中有 11 例出现发热, 占手术成功患者的 45.8%。POSPVE 术后发热的原因主要是因栓塞引起同侧肝脏的无菌性炎症或坏死引起的, 通常要持续 2～4 d。大部分患者(本组有 10 例)均为低热(< 38 ℃), 应鼓励患者多饮水, 同时予酒精擦浴。对部分高热患者, 应注意补充液体和电解质, 同时应用解热镇痛药, 必要时可放置冰袋降温。对所有发热患者, 均应加强口腔护理。本组 1 例高热患者, 体温最高时达 39.6 ℃, 经上述处理后, 第 3 天体温即恢复正常。

POSPVE 是一种较新的微创介入治疗方法, 多数患者对此手术缺乏了解, 常常抱有过高的期望, 也易产生恐惧、怀疑的心理, 因此, 多向患者作耐心细致的解释工作以消除患者的心理障碍是护理工作的重点。加强对术后出血的观察和积极处理胃肠道反应是保障患者术后尽快恢复的关键。

关键词: 术前选择性门静脉栓塞; 护理; 原发性肝癌
中图法分类号: R473.6　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Chijiiwa K, Saiki S, Noshiro N, *et al*. Effect of preoperative portal vein embolization on liver volume and hepatic energy status of the nonembolized liver lobe in humans[J]. Eur Surg Res, 2000, 32(2): 94—99.

[2] Tanaka H, Hirohashi K, Kubo S, *et al*. Preoperative portal vein embolization improves prognosis after right hepatectomy for hepatocellular carcinoma in patients with impaired hepatic function[J]. Br J Surg, 2000, 87(7): 879—882.

（编辑　陈聪连）

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