DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.07.027
第23卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 7
810 2001年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)07-0810-03

压电基因传感器阵列的初步构建

刘明华,府伟灵,汪松林,黄 庆,汪江华 (第三军医大学附属西南医院检验科,重庆 400038)

提 要:目的 初步构建适于临床基因检测的新方法即压电基因传感器阵列。方法 制作2×5型基因传感器阵列,在阵列各检测池的银膜上通过巯基修饰法固定合成大肠杆菌肠毒素基因探针,而后与各靶序列进行杂交,以自制集成电路及电脑软件对频率数据进行采集与分析。结果 12 h内,气相对照检测池频率变化±2 Hz,液相对照检测池频率变化±4 Hz;基因探针固定后频率下降(48±5)Hz;与完全配对的靶序列杂交,0.5 h达到稳定状态,并使频率下降(43±5)Hz;与有1~2个碱基错配的序列杂交,频率下降仅分别为(21±5)、(7±5)Hz,与3个碱基错配的序列及不相关序列杂交,频率无明显变化。结论 初步构建的基因传感器阵列有很好的稳定性和特异性,敏感性尚待进行一步提高。

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

Construction of piezoelectric gene sensor arrays

LIU Ming-hua, FU Wei-ling, WANG Song-lin, HUANG Qing, WANG Jiang-hua (Department of Laboratory Diagnosis, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct the piezoelectric sensor arrays for gene identification in clinical work. Methods Gene sensor arrays of 2×5 were made, gene probes were immobilized on Ag surface, then hybridized with 8 kinds of oligonucleotides, data were collected and analyzed by self-made integrated circuit and computer soft ware. Results In 12 hours, frequency change of gas and liquid controls were less than ±2 Hz and ±4 Hz, respectively. Frequency cut down (48±5)Hz after probe immobilization and (43±5)Hz after a full-matched hybridization for 0.5 hours. Frequency cut down only (21±5)Hz and (7±5)Hz when hybridized with the sequences of 1 and 2 bases mismatching. No change was found following hybridization with target sequences of 3 bases mismatching and non-related target sequences. Conclusion The constructed gene sensor arrays is good in stability and specificity, but need to be improved in sensitivity.

Key words: nucleotide hybridization; sensor array; piezoelectric crystal

随着分子生物学在医学领域中的广泛应用,基因诊断已成为临床疾病诊断必不可少的一个新内容。目前,基因检测主要采用放射性同位素探针标记和PCR等技术,但均存在不尽如意的方面。人们一直在不断地寻求更理想的用于基因检测的新方法。我们跟踪国内外研究进展,以检测大肠杆菌肠毒素特异性序列为基础,初步构建了临床基因检测的新方法——压电基因传感器阵列。

1 材料与方法

1.1 试剂与核酸序列

Tris·HCl缓冲液(10 mmol/L, pH 7.9, 0.2 mol/L NaCl),丙酮(分析纯,重庆化学试剂公司)。

大肠杆菌肠毒素基因探针:5' HS-$(CH_2)_6$-GAGCGGCGCAA-CATTTCAGGTCGA

靶序列1:5' TCGACCTGAAATGTTGCGCCGCTC,与探针序列完全互补

靶序列2:5' TCGTCCTGAAACGTTGCGCCTCTC,与探针序列错配3个碱基

靶序列3:5' TCGACCTCAAATGTTGAGCCGCTC,与探针序列错配2个碱基

靶序列4:5' TCGACCTGAAACGTTGCGCCGCTC,与探针序列错配1个碱基

靶序列5:5' GAGCGGCGCAACATTTCAGGTCGA,与探针序列完全相同

靶序列6:5' TGGGCTTGCGACGCAATCCAGCCTGAACCA(乳突瘤病毒18特异序列)

靶序列7:5' CGCCTCCACCAAATGGTACACTGGAGGATA(乳突瘤病毒11特异序列)

靶序列8:5' CGGCATTCATCTGAATGAT(霍乱弧菌溶血素特异序列)

以上序列均由上海生物工程公司合成。

1.2 传感器阵列制备

如图1所示,为2×5阵列,其中压电晶体为AT切型,镀银,基本频率为10 MHz,晶片直径8.0 mm,银膜电极直径4.5 mm,成都仁和电子有限公司生产,ISSO90质量验证。晶片之一面以胶粘方式形成检测池的底,另一面暴露于空气之中。各检

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870831),国家科技部攻关项目(95-A23-04-04)
作者简介:刘明华(1966—),男,湖北省仙桃市人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事临床感染方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)68754106
收稿日期:2000-08-08;修回日期:2000-12-14

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

测池编号依次为 1、2、. . . 10。9 号检测池作为液相对照, 10 号检测池作为气相对照。

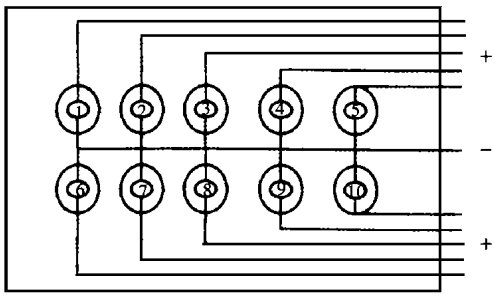


图 1　石英谐振传感器阵列示意图

Fig 1　The schematic diagram of quartz crystal sensor array

1—8: Detection chamber; 9: Liquid control; 10: Air control

1.3　探针固定

将每个检测池中的银膜以丙酮进行清洗 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。在 1～9 号检测池加入 Tris·Cl 缓冲液 70 μl, 待频率稳定, 即依次在 1～8 号检测池分别加入 探针 10 μl(1.0 μmol/ L), 在 9 号检测池加入 10 μl Tris·Cl 缓冲液, 直到频率稳定。

1.4　杂交

吸净并以去离子水清洗各检测池, 氮气吹干, 气相中频率稳定后, 加入 Tris·Cl 缓冲液 70 μl, 待频率稳定, 即依次在 1～8 号检测池分别加入 1～8 号靶序列 10 μl(1.0 μmol/ L), 在 9 号检测池加入 10 μl Tris·Cl 缓冲液。

1.5　数据的采集与分析

通过数据线将传感器阵列、集成晶体振荡电路、计算机相连接。传感器阵列、集成晶体振荡电路处于一电磁屏蔽系统之中。课题组自制集成晶体振荡电路及数据采集与分析软件, 每 20 s 采集一次数据, 并以表格和图形对数据进行整理和分析。上述实验重复 3 次。

2　结果

2.1　基因传感器阵列系统的稳定性

其稳定性由多种因素决定, 本实验观察在 25 ℃, 12 h 内 10 号检测池气相所测频率漂移 ±2 Hz, 9 号检测池液相所测频率漂移为 ±4 Hz。

2.2　探针固定

基因通过修饰的巯基与银膜发生反应而交联固定, 在稳定的液相振荡中加入探针后, 频率均有明显下降(48 ± 5) Hz。固定完成后, 将检测池清洗吹干, 这时气相所测频率与固定前气相所测频率比较, 频率也有明显下降(45 ± 5) Hz, 表明探针已固定于晶体表面。

2.3　基因传感器阵列的特异性和敏感性

1 号检测池探针与靶序列完全配对杂交, 频率变化幅度最大, 下降(43 ± 5) Hz; 4 号检测池探针与靶序列有 1 个碱基错配, 频率下降(21 ± 5) Hz, 3 号检测池探针与靶序列有 2 个碱基错配, 频率下降(7 ± 5) Hz, 2 号检测池探针与靶序列有 3 个碱基错配, 频率变化幅度几乎为 0; 5 号检测池探针与靶序列完全相同, 6、7、8 号检测池探针与靶序列不相关, 频率均无明显变化。

2.4　压电基因传感器的响应时间

1 号检测池杂交结果显示, 加入靶序列后频率出现缓慢下降, 0.5 h 后达到平衡, 下降(43 ± 5) Hz 并保持不变。

3　讨论

目前, 基因检测主要采用放射性同位素标记探针技术以及 PCR 技术, 另外非同位素标记技术近年来也有较快发展。标记探针技术具有灵敏度高、可跟踪定位等特性, 但操作繁琐, 难以自动化。压电基因传感器的原理在于: 晶体表面基因杂交后的质量变化($\triangle m$)与其引起的晶体谐振频率变化($\triangle f$)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[1]。压电基因传感器是通过频率的变化反映基因杂交的情况, 因此不需要标记, 并且可实时监测。构建压电基因传感器阵列, 在阵列的多个检测池中固定同一种探针, 同时检测多份标本的靶基因, 或在阵列上固定不同探针, 检测同一份标本以确定靶基因的某些特性, 这在临床上是相当有意义的。国内外文献迄今尚未见构建压电基因传感器阵列的报道。

探针的固定是构建传感器的基本条件。我们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, 而后通过巯基与银表面的反应, 将核酸探针固定于基因传感器的银膜电极表面, 可构成结合牢固、排列有序、分布均匀的单层 DNA 分子膜[2,3]。

稳定性是影响其技术测定的主要因素之一。晶体在液相中振荡要受多种因素的影响, 如外界温度、磁场、气压、震动, 液体的粘度、密度、电导性, 当然最重要的影响因素是振荡电路和晶体本身。我们在总结其他研究的基础上, 设计了一种有负反馈的集成振荡电路, 能消除或减少以上因素的影响。本实验设立的对照检测池气相和液相均能在较长时间内保持频率稳定, 证明整个检测系统稳定可靠, 同时也表明其它检测池的频率漂移是由基因固定或杂交所致。

特异性是基因传感器阵列能否应用于基因检测的关键因素。本实验显示: 探针与靶序列完全配对的检测池, 频率变化幅度最大; 探针与靶序列发生不同程度的序列错配的检测池, 频率变化幅度明显减小; 而探针与靶序列完全不相关的检测池频率无明显变化。这表明了基因传感器阵列检测基因具有较好的特异性。

敏感性将是基因传感器阵列能否得到推广并应用于临床的限制因素, 本实验中构建的基因传感器阵列

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

灵敏度偏低，与石英晶片的品质及探针的固定方法等有关。根据Sauerbrey方程，参照AT切型石英的弹性模量和密度常数，可得 $\triangle f = -2.26\times 10^{-3} f^2 \triangle m$，10 MHz石英晶体的灵敏度为 $\triangle m/\triangle f = -1/(2.26\times 10^{-3}\times 10^2) = -4.425$ ng·cm^{-2}·Hz^{-1}。最近有作者在这方面作了一些有意义的探讨，如应用更高频率的石英晶体、采用多层DNA探针膜增大DNA杂交的容量或在检测池中加入引物使发生引物链延伸反应等[4~6]，但在具体实践中会受到很多因素的限制。利用微细加工技术直接在石英晶体上刻蚀出超薄石英谐振器阵列，提高其灵敏度，将是今后进一步研究的方向。本实验中杂交响应时间较长，有作者认为这与DNA直接固定于电极表面造成杂交的空间障碍或探针其它部位与基底膜发生非特异性反应有关[5]。如何缩短响应时间，这也是下一步的研究中需要解决的问题。

参考文献：

[1] 姚守拙. 压电化学与生物传感[M]. 长沙：湖南师范大学出版社，1997. 39—50.
[2] 邓文礼，杨大本，方 晞，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.
[3] 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.
[4] Okahata Y，Kasanori 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.
[5] Caruso F，Rodda E，Furlong D N. Quartz crystal microbalance study of DNA immobilization and hybridization for nucleic acid sensor development[J]. Anal Chem，1997，69(11)：2 043—2 049.
[6] 陈誉华，宋今丹，李大为. 基于引物链延伸反应的基因传感器的研究[J]. 中国科学(C辑)，1997，27(4)：300—305.

（编辑 薛国文）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2001)07-0812-01

安定、度冷丁对胎儿心率及声振刺激试验的影响

Effects of diazepam, dolantin on fetal heart rate and vibroacoustic stimulation test

李 真，武民俭，杜保琳 （第三军医大学附属新桥医院妇产科，重庆 400037）

本研究对安定、度冷丁两种产科常用安眠、镇痛药对胎儿心率及声振刺激试验的影响做了前瞻性研究。

1 方法

201例足月单胎孕妇随机分为安定组(103例)和度冷丁组(98例)，两组产妇一般情况、产科情况及围产儿预后无差异，分别监测静推安定10 mg或肌注度冷丁100 mg前、后胎心率基线、基线变异、声振胎动试验(Sound provoked fetal movement，SPFM)、声振胎心试验(Vibroacoustic stimulation-test，VAS-T)并进行比较。

2 结果

安定组用药后胎心率基线无改变，基线变异显著减小，SPFM、VAS-T阳性率显著降低。度冷丁组用药前、后胎心率基线、基线变异、SPFM、VAS-T阳性率差异均无显著性。

3 讨论

研究表明妊娠28周后的正常胎儿对声振刺激能产生胎动、胎心率加速等生理反应。近年来我们将声振刺激引起的胎动、胎心率加速做为评价胎儿宫内健康状况的监护指标，取得了满意的效果[1]。安定、度冷丁是产程中常用的镇静、镇痛药物，其对胎儿声振刺激试验是否有影响目前尚未见报道。本研究表明孕妇静推安定后10~20 min，胎儿出现胎心率基线变异减少，20%的胎儿对声振刺激缺乏反应，提示安定能迅速通过胎盘屏障，抑制胎儿中枢神经系统，影响其对声振刺激的反应，孕妇使用安定后做声振刺激试验会出现假阳性结果，在临床工作中应引起注意。而肌注度冷丁20~30 min后胎心率无明显改变，胎儿对声振刺激的反应也不受影响，提示度冷丁对胎儿中枢神经系统的影响较小，声振胎动、胎心试验结果不受其影响。

关键词：安眠药；镇痛药；振动；声刺激胎儿监护
中图法分类号：R714.15 文献标识码：B

参考文献：

[1] 李 真，武民俭，杜保琳. 振动声音刺激引起胎动胎心率加速对预测胎儿预后的意义[J]. 中国实用妇科与产科杂志，1993，9(4)：217—219.
[2] Smith C V. Vibroacoustic stimulation[J]. Clin Obstet Gynecol，1995，38(1)：68—77.
[3] Petrovic O，Skunca E，Matejcic N. A simplified fetal biophysical profile[J]. Int J Gynecol Obstet，1998，61(1)：9—14.

（编辑 王 红）

作者简介：李 真(1963—)，女，云南省昆明市人，博士，主治医师，讲师，主要从事围产医学方面的研究。电话：(023)68755114-74612

收稿日期：2000-01-30；修回日期：2000-03-09

?1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net