DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.01.008
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)01-0015-02

论著

离子强度对压电传感器基因杂交动力学的影响

刘明华[1],府伟灵[2],张 雪[2],陈 鸣[2],薛 强[2] (第三军医大学附属西南医院:[1]ICU;[2]检验科;重庆 400038)

提 要:目的 探讨盐离子浓度对压电传感器基因杂交动力学的影响。方法 设计并合成金黄色葡萄球菌耐药基因探针及与其完全互补的靶序列,在石英谐振压电传感器阵列上进行杂交,杂交缓冲液中含5种NaCl浓度。计算机采集并分析传感器频率数据得出杂交动力学参数,同时比较各盐离子浓度下杂交达到平衡所需时间,杂交前后的频率差,平衡后频率波动幅度大小。结果 随NaCl浓度增加,结合速率常数、杂交平衡常数、最大杂交量均呈现明显增大趋势,而离解速率常数呈下降趋势,杂交前与杂交平衡后的频率差值增大,同时,杂交平衡后频率波动幅度相应增大,杂交达平衡所需时间延长。结论 一定的盐离子浓度促进基因杂交,但盐离子浓度过高则对晶体振荡性能产生负面影响。

关键词:核酸杂交;离子强度;压电晶体;传感器
中图法分类号:R446.5;TP212.3 文献标识码:A

Effects of ionic strength on kinetic parameters of hybridization with piezoelectric gene sensor arrays

LIU Ming-hua, FU Wei-ling, ZHANG Xue, CHEN Ming, XUE Qiang (Department of Clinical Laboratories, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of ionic strength on kinetic parameters of hybridization with piezoelectric gene sensor arrays. Methods A gene sensor array of 2×5 was made with gene probes of drug resistant genes from *Staphylococcus aureus* immobilized on gold coated surfaces. The complementary sequences of these genes were hybridized on the gene sensor in 5 kinds of Tris-HCl buffer solutions containing NaCl at different concentrations. The data of sensor frequency were collected and the kinetic parameters analyzed with computer. The hybridization time and frequency changes were compared at different NaCl concentrations. Results With the increase of NaCl concentration, binding rate constant, association constant, maximum binding amount and the frequency differences between before and after hybridization were all increased, but dissociation constant was decreased. Meanwhile, the range of frequency fluctuation was extended and the time for hybridization prolonged along with the increase of NaCl concentration. Conclusion Proper ionic strength is beneficial for gene hybridization, but high ionic strength is harmful to the oscillation of piezoelectric crystal.

Key words: nucleotide hybridization; ionic strength; piezoelectric crystal; sensor

随着分子生物学在医学领域中的迅速发展,基因诊断已成为临床疾病诊断的重要手段之一。我们跟踪国内外研究进展,初步构建了临床基因检测的新方法,即压电传感器阵列基因检测系统[1]。基因杂交需有一定的离子强度作为其基本条件,而晶体振荡本身对离子强度又可能有一定的限制,因此选择合适的离子强度相当重要,本实验拟就此进行探讨。

1 材料与方法

1.1 试剂

Tris-HCl缓冲液,pH均为7.9,浓度均为10μmol/L,分别含有5种NaCl浓度:0.5、0.3、0.2、0.1、0.05 mol/L;去离子水;丙酮溶液(重庆化学试剂公司);6-巯基己醇(aldrich公司);金黄色葡萄球菌耐药基因探针:5' HS-$(CH_2)_6$-CCAGGAATG-CAGAAAGACC,与探针互补的靶序列:5' TGGTCTTTCT GCATTC-CTGG,上海生工公司合成。

1.2 仪器

传感器阵列为2×5,其中压电晶体为AT切型,被金,基本频率为10 MHz,晶片直径8.0 mm,金膜电极直径4.5 mm。传感器阵列与晶体振荡电路相连接后置于一屏蔽系统之中,而后通过数据采集电路系统将频率数据输入计算机进行储存和分析。

1.3 操作步骤

将每个检测池中的金膜以丙酮进行清洗3次,而后以去离子水清洗3次,氮气吹干,将传感器阵列与电路系统相连接,在气相中测定其频率直到频率稳定。在(1~10)号检测池各加入Tris-HCl缓冲液70μl,1、2号检测池含0.5 mol/L NaCl,3、4号检测池含0.3 mol/L NaCl,5、6号检测池含0.2 mol/L NaCl,7、8号检测池含0.1 mol/L NaCl,9、10号检测池含0.05 mol/L NaCl。测定频率直到稳定。在1~10号检测池中加入探针10μl,终浓度为1.0μmol/L,室温静置3 h。在1~10号检测池中加入1.0 mmol/L的6-巯基己醇10μl进行封闭,观察至频率稳定。吸净各检测池中液体并以去离子水清洗,氮气吹干,气相中测定频率直至稳定。在1~10号检测池各加入Tris-HCl缓冲液70μl,1、2号检测池含0.5 mol/L NaCl,3、4号检测池含0.3 mol/L NaCl,5、6号检测池含0.2 mol/L NaCl,7、8号检测池含0.1 mol/L NaCl,9、10号检测池含0.05 mol/L NaCl,测定频率直到稳定。在1~10号

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:刘明华(1966—),男,湖北省仙桃市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事临床感染方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68754106
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

检测池中加入靶序列 10 μl(终浓度为 1.0 μmol/L),观察频率 4 h。上述操作共作 3 次。

1.4 杂交动力学参数的测定

基因杂交时其杂交动力学可表述为:

$$[\text{probe}] + [\text{target}] \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} [\text{hybridization}]$$

在杂交开始后任意时刻 t 的杂交量 Δm_t 可以从下列方程得到[2]:

$$[\text{hybridization}]_t = [\text{hybridization}]_\infty (1 - e^{-(1/\tau)t})$$

$$\Delta m_t = \Delta m_{max} (1 - e^{-(1/\tau)t})$$

$$\tau^{-1} = k_1 [\text{target}]_0 + k_{-1}$$

$$k_a = k_1 / k_{-1}$$

其中 Δm_{max} 为靶核苷酸的最大杂交量,τ 为键合的松弛时间,$[\text{target}]_0$ 为靶序列的初始浓度,k_1 为结合速率常数、k_{-1} 为离解速率常数、Ka 为杂交平衡常数。在我们的实验中,$[\text{target}]_0$ 是 1.0 μmol/L,而每个时刻的频率变化是已知的,通过 Sauerbrey 方程[3] 和电极的实际参数值,可以得到公式:$\Delta m = 4\,425 \times \Delta f$($\Delta m$ 单位:ng/cm²)。利用实验数据和上述公式,可以计算得到动力学参数 k_1、k_{-1}、Ka、Δm_{max}。

1.5 统计学处理

比较各盐离子浓度下杂交达到平衡所需时间,杂交前后的频率差,平衡后频率波动幅度大小。上述各数据采用 *t* 检验进行统计学分析。

2 结果

2.1 杂交动力学比较

随[NaCl]浓度增加,k_1、k_a、Δm_{max} 均呈现明显增大趋势,而 k_{-1} 呈下降趋势,见表 1。

表 1 不同离子强度下基因杂交动力学比较

Tab 1 Kinetic parameters in different ionic strengths

[NaCl] (mol/L)	k_1 10^3(mol/L)$^{-1}\cdot s^{-1}$	k_{-1} $10^{-3} s^{-1}$	k_a 10^6(mol/L)$^{-1}$	Δm_{max} (ng/cm²)
0.05	18±3	42±5	0.43±0.18	147.16±21.11
0.1	26±5 *	23±4 *	1.13±0.58 **	158.48±32.76 *
0.2	51±8 **	7.0±2.1 **	7.29±1.51 **	216.38±29.34 **
0.3	48±6	4.1±2.0 *	11.70±3.47 *	225.75±35.85 *
0.5	81±9 *	6.1±2.3	13.27±4.62 *	280.75±41.42 **

*: $P<0.05$ **: $P<0.01$ *vs* closely former group

2.2 平衡时间及幅度比较(靶序列终浓度为 1.0 μmol/L 时)

随 NaCl 浓度增加,杂交之前与杂交平衡后的频率差值增大,同时,加入靶序列后杂交达平衡所需时间和杂交平衡后频率波动幅度也相应增大,见表 2。

表 2 不同离子强度下平衡时间及幅度比较

Tab 2 Time courses and frequency fluctuations in different ionic strengths

[NaCl] (mol/L)	Hybridization time (min)	Frequency shift by hybridization (Hz)	Frequency fluctuation after hybridization (Hz)
0.05	10±3	10±3	8±3
0.1	17±3 *	19±5 *	10±3
0.2	27±4 *	43±8 **	12±4
0.3	29±4	47±8	20±6 **
0.5	43±5 *	59±10 *	36±8 **

*: $P<0.05$ **: $P<0.01$ *vs* closely former group

3 讨论

DNA 链上的磷酸基团带有较多的负电荷,它们之间的静电荷互相排斥,是导致其双链不稳定的重要因素。在无盐的溶液中,DNA 双链在室温下就会变性,加入盐离子后,其正离子可以封闭磷酸基团所带的负电荷,削除其间的静电斥力,使双链的稳定性增加,有利于杂交分子的形成。因此一般常见的杂交体系均须有一定的离子强度,在低离子强度下,核酸杂交比较缓慢,随着离子强度的增加,杂交反应率增加。此效应在低盐浓度(< 0.1 mol/L NaCl)时更明显。从本实验中可得到证明,加入低浓度盐的杂交体系中频率变化极小。而随着离子浓度从 0.05 mol/L 到 0.5 mol/L,频率变化幅度也从不到 10 Hz 增加到 53 Hz,显示杂交效率明显增加。从其杂交动力学分析可看出,因为其结合率常数逐渐增加,而离解率则减小,其结果就是杂交平衡常数和最大杂交量均增大。

压电基因传感是近年发展起来的一种新的基因检测手段[4]。压电传感器又称石英晶体微天平(QCM),对质量变化非常敏感,具有 ng ~ pg 级的质量检测能力,能够检测微观过程中的微小变化,因此基因杂交过程可以在传感器上检测出来。石英晶体在含电解质的杂交体系中,其振荡性能要受溶液电解质浓度的影响,晶体的振荡频移(平衡时频率波动幅度)随溶液浓度的增大而线性增大。其线性斜率与电解质种类无关,仅决定于溶液的电导率。溶液浓度更大时,斜率不断增大,浓度过高甚至会引起晶体停振[5]。另外,基因杂交导致的质量变化很小,其表现出来的频率变化值(数十或百 Hz)远低于其基本频率值(数兆 Hz),因此控制晶体的振荡性能显得尤其重要,其在液相中自身的频移值要尽可能地控制在最小值,以免影响结果判断。从本实验可以看出,随着离子浓度从 0.05 mol/L 到 0.5 mol/L,尽管杂交引起的频率下降幅度有所增加,但晶体的频率稳定性降低,其自身频移值明显增大。实验结果还显示:在靶序列加入后,达到平衡状态所需时间随离子强度增大而明显延长,这可能是离子强度增大后杂交总量增大所引起的结果。

参考文献:

[1] 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.

[2] Ebara Y, Okahata Y. A kinetic study of concanavalin A binding to glycolipid monolayers by using a quartz-crystal microbalance[J]. J Am Chem Soc, 1994, 116(25): 11 209-11 212.

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

[4] 刘明华,黄 庆,府伟灵. 压电基因传感器研究进展[J]. 国外医学:临床生物化学与检验学分册,2001,22(5):259-260.

[5] 姚守拙 著. 压电化学与生物传感[M]. 长沙:湖南师范大学出版社,1997.176-195.

(编辑 王 红)

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