DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.10.029
第23卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 10
2001年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2001

文章编号:1000-5404(2001)10-1197-03

论著

探针浓度对压电传感器基因杂交效应的影响

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

提 要:目的 探讨探针浓度对压电传感器基因杂交效应的影响。方法 9种浓度的探针与同一浓度的靶序列在压电传感器阵列上进行杂交,计算机采集并分析传感器频率数据,比较各探针浓度下固定前后频率差、杂交达到平衡所需时间,杂交前后频率差,同时,根据较低浓度数据得出的杂交动力学参数,计算各浓度下的频率变化理论值。结果 随探针浓度增加,固定引起的频率变化值逐渐增加;杂交时间有缩短趋势;杂交前后的频率差值在探针浓度较低(1 nmol/L~0.5 μmol/L)时逐渐增大,而探针浓度较高(1.0~3.5 μmol/L)时反而减小。高浓度时杂交前后频率变化理论值与实际值存在明显差异。结论 在石英晶体传感器阵列上,基因杂交效率随探针浓度增加而增大,但探针浓度过高反而抑制杂交,其原因可能主要在于探针之间的空间构象关系和静电排斥。

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

Effects of probe concentration on hybridization efficiency of piezoelectric gene sensor arrays

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

Abstract: Objective To investigate the effects of probe concentration on hybridization efficiency of piezoelectric gene sensor arrays. Methods Gene sensor arrays of 2× 5 were made, 9 different concentration of gene probes were immobilized on Au surfaces and hybridized with its complementary sequences of same concentration seperately. Data of frequency was collected and analyzed. Hybridization time and frequency differences caused by immobilization and hybridization under different probe concentration were compared and the frequency differences obtained from measurement were compared with the theoretical value. Results With the increase of the probe concentration, frequency difference caused by immobilization increased, and hybridization time with a trends of shortening. While the frequency difference made by hybridization, tended to raise in a rather low probe concentration but decreased in higher probe concentration, which was quiet different with that of the theorical value. Conclusion In the piezoelectric gene sensor arrays, proper probe concentration enhances gene hybridization, but excessive concentration would inhibit gene hybridization, which could probably be explained by the steric and electrostatic hindrances.

Key words: nucleotide hybridization; probe; piezoelectric crystal; sensor array

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]。在石英晶体电极表面固定探针后与靶序列进行杂交,从而检测靶序列的一些特性。固定探针的浓度对杂交效率会产生一定的影响,但浓度多少最合适,目前尚无报道,本实验拟就此进行探讨。

1 材料和方法

1.1 试剂

Tris·HCl缓冲液,pH 7.9,浓度10 μmol/L,含NaCl浓度0.2 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-(CH2)6-ccaggaatgcagaaagacc,与探针互补的靶序列:5′-tggtctttct gcattcctgg,上海生工公司合成。

1.2 仪器

传感器阵列为2× 5,其示意图参见文献[1],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~ 9号检测池各加入Tris·Cl缓冲液90 μl,测定频率直到稳定。在1~ 9号检测池中加入探针10 μl,终浓度依次为:3.5、1.0、0.5、0.1 μmol/L及50、10、5、1、0.1 nmol/L,10号检测池加入Tris·Cl缓冲液10 μl作为对照,室温静置3 h。在1~10号检测池中加入1.0 mmol/L 6-巯基己醇10 μl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·Cl缓冲液90 μl,测定频率直到稳定。在1~10号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6次。

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7篇。电话:(023)68754106
收稿日期:2000-12-01;修回日期:2001-01-27

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

比较各探针浓度下固定前后的频率差、杂交达到平衡所需时间、杂交前后的频率差。

1.4 杂交动力学参数的测定

基因杂交时杂交动力学可表述为:

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

当探针浓度逐渐增加,而靶序列浓度维持不变时,各探针初始浓度[probe]$_0$与杂交平衡时的杂交量Δm存在如下关系(公式一)[2]:

$$\frac{[\text{probe}]_0}{\Delta m} = \frac{[\text{probe}]_0}{\Delta m_{max}} + \frac{1}{\Delta m_{max} k_a}$$

$k_a = k_1 / k_{-1}$

其中ΔMmax为靶核苷酸的最大杂交量,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。根据化学平衡的原理,Δm_{max}和ka在不同的浓度下是一个不变值,选择5、50 nmol/L作为两个[probe]$_0$,利用实验数据、上述公式及Sauerbrey方程($\triangle f = -k \triangle m$)[3],可以计算得到动力学参数ka、$\Delta m_{max}$,将此值代入公式一,计算各浓度下杂交平衡时的理论杂交量。

1.5 统计学分析

上述各数据均采用t检验。

2 结果

2.1 不同探针浓度下平衡时间及频率变化比较

随探针浓度增加,固定引起的频率变化值逐渐增加;杂交时间有缩短趋势,浓度高的检测池杂交时间减少更明显;探针浓度从1 nmol/L到0.5 μmol/L,杂交之前与杂交平衡后的频率差值增大,而探针浓度为1.0 μmol/L及3.5 μmol/L时频率差值反而有所减小。探针浓度为0.1 nmol/L时,传感器未能显示出频率变化;10号检测池频率无明显变化,见表1。

表1 不同探针浓度下平衡时间及频率变化比较($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Time course and frequency changes during immobilization and hybridization($\bar{x} \pm s$)

[probe]	Fd by immobilization (Hz)	Hybridization time (min)	Fd by hybridization (Hz)	Fd by hybridization in theory (Hz)
0.1 nmol/L	0	—	0	0.4±0.1
1 nmol/L	5.8±3.2	35±3	5.1±1.0	3.7±1.0 **
5 nmol/L	18.1±3.9 **	33±3	14.4±3.3 **	14.0±3.3 **
10 nmol/L	30.4±4.4 **	34±3	23.1±4.3 **	21.8±4.7 **
50 nmol/L	37.2±4.2 **	31±3	39.3±5.2 **	39.3±5.2 **
0.1 μmol/L	42.7±3.9 *	31±4	44.5±5.3 **	43.7±5.1 **
0.5 μmol/L	48.8±4.7 *	29±3 *	47.9±7.7 *	48.1±7.4 *
1.0 μmol/L	50.4±6.3 *	27±4 *	43.1±4.2 **	48.6±7.5 ++
3.5 μmol/L	54.9±5.3 *	20±5 **	38.6±4.4 *	49.1±6.4 ++

Fd: Frequency difference; *: $P<0.05$ **: $P<0.01$ *vs* closely lower concentration group; ++: $P<0.01$ *vs* measurement value of frequency difference caused by hybridization

2.2 杂交动力学参数测定

选择5、50 nmol/L作为两个[probe]$_0$,根据前面所述公式一和表1数据,可得:ka=7.96×10^7 M^{-1}, Δm_{max}=217.74 ng/cm^2。将ka值、Δm_{max}值代入公式一,可得公式二:$\Delta f = 3.92\times10^9 \times [\text{probe}]_0 / (7.96\times10^7 \times [\text{probe}]_0 + 1)$。根据公式二计算所得的理论值与实际测得的数据比较,[probe]$_0$=1.0 μmol/L及[probe]$_0$=3.5 μmol/L时,实际频率变化值有明显减小。

3 讨论

压电基因传感是近年发展起来的一种新的基因检测手段。其检测原理是以Sauerbrey理论为基础,在一定的范围内,我们可用$\triangle f = -k \triangle m$这一简化了的方程式来表示[3]。Sauerbrey理论是在1959年从气相中推导出来的,自从80年代成功实现稳定的晶体液相振荡后,人们研究发现,在一定的条件下,液相中质量与频率的关系仍可以Sauerbrey方程来表示,即晶体表面的质量变化($\triangle m$)与其引起的晶体谐振频率变化($\triangle f$)之间存在简单的线性函数关系[2]。石英晶片对质量变化非常敏感,能反应ng~pg级的微小质量变化,因此基因杂交这一微观变化过程过程可以在压电传感器上检测出来。

两条互补的DNA单链在一定的条件下进行杂交时,其杂交效率与DNA的初始浓度有关。从实验数据可知,随探针浓度增加,固定探针所引起的频率变化值增大,也即固定在晶体金膜表面的探针数量越大;随探针浓度增加,杂交导致的频率变化值也依次迅速增大,此结果与实验预期一致。实验同时发现,高浓度探针([probe]$_0$=1.0 μmol/L及[probe]$_0$=3.5 μmol/L)与靶序列杂交后,实际测得的杂交导致的频率变化值不但不增加,反而有所下降,这一点与理论不符。从前面所述的公式一可知,在杂交反应条件(如温度、离子强度等)不变的情况下,理论上Δm与[probe]$_0$呈一饱和曲线关系,也即Δf与[probe]$_0$在理论上应呈一饱和曲线关系。杂交反应开始时DNA链的浓度越高,分子之间互相碰撞的几率越大,从而使杂交效率增大,主要表现就是杂交时间缩短和杂交量增加,这一特点在DNA的初始浓度较低时尤其明显。在本实验中,选择较低的初始浓度值5、50 nmol/L作为两个[probe]$_0$,根据公式一计算所得的理论值证明了这一点。在较低浓度时,随[probe]$_0$增加,Δf值增加显著,而在较高浓度时,Δf值变化较小。

分析杂交过程,高浓度探针固定后杂交效率反而下降的原因可能主要与探针的空间排列结构和DNA分子间的静电排斥有关。本实验中探针的固定是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,而后通过巯基在金表面发生氧化反应生成硫金化合键,将核酸探针固定于基因传感器的金膜电极表面,从而构成结合牢固、分布均匀的单层DNA分子膜,在这单层分子膜中,各探针DNA分子排列有序并且其空间取向一致,即均与金膜平面呈相同的夹角[4,5],这种空间结构就对本身具有静电排斥反应的DNA分子之间的杂交构成了一定的影响。可以推测,探针浓度过大,它们在金膜表面的排列就会相当紧密,探针分子之间的空间也就比较小,从而使靶分子难以进入DNA分子膜与DNA探针进行杂交,造成高

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

浓度探针时杂交效率的降低。

实验中非杂交引起的质量效应可能会造成一定的频率效应，本实验应用 6-巯其己醇封闭金膜表面，消除了 DNA 与金膜的非巯基结合，使非杂交引起的质量效应降为最低[6]；虽然在一定的条件下，Sauerbrey 理论适用于液相振荡，但液相振荡时非质量因素（探针浓度不同，杂交液体的密度和粘滞度也会稍有不同）对频率仍会有一定的影响[7]，我们从设计电路及实验操作方面入手，尽量减少非质量因素对频率的影响。理论上，这两方面的因素均使高浓度探针时的杂交频率变化更大，因此它们不是导致高浓度时频率测定值下降的原因。但尽管如此，如何进一步消除非杂交质量效应以及区分粘度、密度等非质量因素与杂交所致频率效应，值得下一步研究中更深入地探讨。

参考文献：

[1] 刘明华，府伟灵，汪杜林，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] 邓文礼，杨大本，方　晔，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.
[5] 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.
[6] Herne T M，Tayloy M. Characterization of DNA probes immobilized on gold surface[J]. J Am Chem Soc，1997，119(38)：8 916－8 920.
[7] 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. 172－231.

（编辑　谢义霞）

文章编号：1000-5404(2001)10-1199-01

个案与短篇

He-Ne 激光血管内照射对健康兔红细胞变形能力影响的研究

Studies on the effects by intravascular He-Ne laser irradiation on red blood cell deformability

邓　玲[1]，陈仕国[1]，马显光[1]，王仕丽[2]，陈　敏[3]，熊继尧[4]　（第三军医大学：[1]基础医学部物理学教研室；[2]预防医学系毒理学教研室；[3]基础医学部生物化学教研室；重庆 400038；[4]重庆药剂学校，重庆 400030）

弱激光血管内照射能降低血液粘度，增强其流动性，改善微循环，临床上已用于治疗缺血性脑血管疾病等多种疾病[1,2]。由于红细胞是血液中最主要的有形成分，血液的流动性主要取决于红细胞的变形能力。因此，我们采用可靠性高的激光衍射法[3]，专题研究弱激光对红细胞变形能力的影响，以便全面了解激光刺激因子对血液流变学的作用。

1　材料与方法

1.1　动物

选健康大耳白兔 8 只，体重(1.9±0.3) kg，雌雄不限，随机分成照射组和对照组，每组各 4 只。实验动物由第三军医大学实验动物中心提供并饲养。

1.2　方法

照射组采用输出波长为 632.8 nm 的国产 He-Ne 激光器，由光纤耦合经光针作兔耳外周静脉血管内照射，照射功率 5 mW，每天按时照射 1 次，每次 50 min。

照射前、照射 1 次后 24 h、照射 7 次后各取静脉血(肝素抗凝) 100 μl，用国产 BL-C 型红细胞变形仪检测红细胞变形指数。所有血样均在 4 h 内测定。对照组除不进行激光照射外，其余操作与照射组相同。

1.3　统计学处理

所有数据采用单因素方差分析。

2　实验结果

依据红细胞变形仪拍摄的红细胞衍射图，见图 1，用计算机图形软件计算红细胞变形指数。结果表明：第 1 次照射后与照射前比较，在高切和中切时红细胞变形指数提高显著($P<0.05$)，低切时提高非常显著($P<0.01$)；7 次照射后与照射前比较，红细胞指数提高均非常显著($P<0.01$)。而各种情况下对照组的红细胞变形指数无统计性差异($P>0.05$)。在照射组中，又以第 1 次照射后红细胞变形指数提高的幅度最为显著(中切时，1 次照射后红细胞变形指数提高 23.44%，7 次照射后仅提高 34.38%)。见表 1。

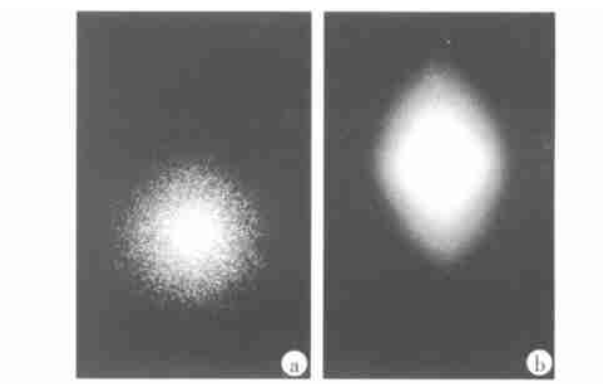


图 1　红细胞衍射典型图
a：照射前；b：照射后

作者简介：邓　玲(1957－)，女，重庆市人，硕士，副教授，主要从事激光生物效应及光信息处理方面的研究。电话(023) 68752213

收稿日期：2001-02-12；修回日期：2001-06-30

（下转 1202 页）

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