

亲和素-生物素间接偶联的压电 DNA 传感器研究*

高志贤** 晁福寰 王红勇 房彦军 宁保安

(军事医学科学院卫生学环境医学研究所, 天津 300050)

潘海峰 朱惠忠

(清华大学精密仪器与机械学系, 北京 100084)

摘要 采用 3'-二巯基硫代丙酸的金电极自组装技术, 用乙基 3-(3-二甲氨基) 碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 和 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 偶联剂将亲和素固定于金电极上, 联于生物素标记的探针, 制备成压电 DNA 传感器的检测电极, 和杂交液中的待检葡萄球菌肠毒素 B 的 ssDNA 进行杂交, 通过频率信号检测 DNA 杂交的量, 达到检测的目的. 采用不同长度的基因片段进行了研究, 制作的传感器一致性、特异性都较好; 杂交后的电极, 电极再生后, 传感器可以重复使用.

关键词 压电 DNA 传感器, 生物素-亲和素体系, 分子自组装膜

学科分类号 R392.11

自 20 世纪 70 年代引入免疫化学之后, 生物素-亲和素体系 (biotin-avidin system, BAS) 形成了具有发展前途的体系^[1]. 由于生物素与亲和素结合速度快、结合物稳定性高, 生物素分子易于活化, 与核酸分子偶联率高而不影响核酸的生物活性; 而且此体系运用方式灵活多变, 适于不同的设计要求, 因此 BAS 已成为生命科学研究中一个重要体系. 近年来, BAS 在压电核酸传感器研究中应用颇多, 主要是 BAS 本身的固定化问题以及应用 BAS 固定生物物质的研究. BAS 的固定化有多种形式: 亲和素可以直接地不可逆吸附到 Au、Ag 等电极表面上形成亲和素单分子层; BAS 也可以吸附在电极表面形成生物素分子的固定层^[2,3], 从而来固定 BAS 体系.

亲和素-生物素具有独特的相互作用^[4], 在一定范围内敏感膜可制成有序排列的层状结构. 由于核酸很容易生物素化^[5,6], 且生物素化后核酸的活性不降低, 因此通过亲和素-生物素的特异性结合, 可以有效地设计分子结构单元来赋予膜特定功能, 且制备过程的优化可以分步进行. 因此, 本实验将对亲和素-生物素间接偶联的压电 DNA 传感技术进行研究.

1 实验器材

1.1 器材

AT 方向切割, 3.58 MHz 和 10 MHz, 被覆金电极, 电极直径分别为 5.5 mm、8.5 mm 压电石

英晶体的传感元件 (北京压电晶体研究所); PCR 扩增仪 (PE-2400); CS-930 扫描电子显微镜; 网络分析仪; 频率测定仪 (Model 8610B); 振荡器 (自行设计).

1.2 试剂

3,3'-二巯基硫代丙酸 (Fluka Co.); N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS, Fluka Co.); 乙基 3-(3-二甲氨基) 碳二亚胺盐酸盐 (EDC, Fluka Co.); 亲和素 (Fluka Co.); 乙醇胺 (AR, 北京益利精细化学品有限公司), 1000A (产葡萄球菌肠毒素 A, SEA)、1093C (产葡萄球菌肠毒素 C, SEC)、494D (产葡萄球菌肠毒素 D, SED)、216B (产葡萄球菌肠毒素 B, SEB) 等标准菌株 (美国威斯康星大学); 生物素标记的 dUTP (Sigma 公司); 生物素 (biotin) -5'-TGATATTAATTTCGCATCAAA-CTGAC-3' (HPLC 纯化).

2 实验方法

2.1 生物素标记的 SEB 169 bo 基因片段的制备方法

2.1.1 PCR 体系: 50 μ l 反应体系中含混合引物 4 μ l (0.05 μ mol/L), 10 $\times$ PCR 缓冲液 5 μ l, dNTP 2 μ l (0.025 μ mol/L), 模板 1 μ l (5 μ g/L), 无菌去离子水 38 μ l, Taq DNA 合成酶 4 U.

* 国家自然科学基金 (39970644) 和天津市自然科学基金 (003608111) 资助课题.

** 通讯联系人.

Tel: 022-84655403, E-mail: gaozhx@hotmail.com

收稿日期: 2001-11-19, 接受日期: 2001-12-25

2.1.2 方法: 在 PCR 扩增的同时, 进行 DNA 生物素标记, 即将 Bio-11-dUTP 掺入到 PCR 扩增产物中, 扩增时生物素化的 dUTP 与 dTTP 的比例为 1:3 代替 dTTP. 具体扩增步骤: 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 30 s, 56℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 30 个循环, 72℃ 延伸 7 min. 将扩增产物用琼脂糖凝胶电泳纯化后, 用 Tris-EDTA (TE) 缓冲液稀释, 并用蛋白质核酸分析仪定量, 用时在 100℃ 沸水中煮 5 min, 使 DNA 完全变性, 立即放入冰水中, 10 min 后即可使用^[7].

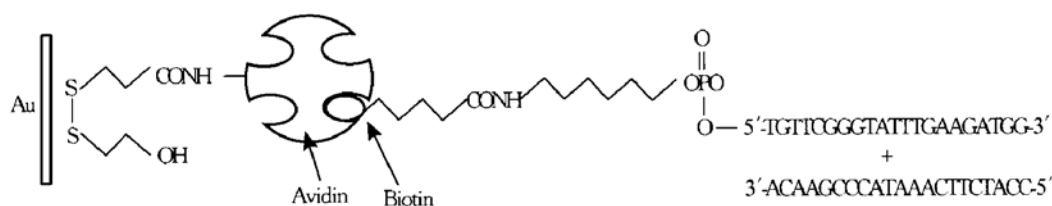


Fig. 1 Principle illustration of avidin-biotin system on immobilization and hybridization

2.2.2 固定化和杂交

2.2.3 PZ 金电极表面的处理: 将镀金的石英晶片用双氧水和硫酸 (1:3) 处理电极表面, 除去电极表面有机物等杂质, 然后用纯水冲洗几次.

2.2.4 亲和素-生物素偶联: 在室温下, 将经过处理电极表面洁净的石英晶片浸入 3 ml 1 mmol/L 3,3'-二硫代丙酸中, 20 min 后, 达到饱和, 再加入 N-羟基琥珀酰亚胺, 在加入水溶性的 1-乙基-3

2.2 亲和素-生物素间接偶联法

2.2.1 原理: 用 3,3'-二硫基硫代丙酸的金电极自组装技术, 用 EDC 和 NHS 偶联剂将亲和素固定于金电极上, 在水溶性碳二亚胺 (EDC) 存在下, $-NH_2$ 与生物素标记的探针 DNA 5' 端磷酸基缩合而共价结合到电极表面^[8,9]. 制备成压电核酸传感器的检测电极, 和杂交液中的待检互补的 SEB ssDNA 进行杂交, 根据 Sauberay 方程^[10], 频率的变化与质量的变化成负相关关系, 通过频率信号检测 DNA 杂交量, 达到基因检测目的 (图 1).

[3-二甲胺] 丙基-碳二亚胺 (EDC), 30 min 后达到饱和. 将已经羧基化的石英晶体浸入含有亲和素 (10 μ g, $M_r = 68\ 000$) 的 3 ml 缓冲液 (pH 7.9, 10 mmol/L Tris-HCl, 0.2 mol/L NaCl) 中, 1 h 后取出, 用缓冲液洗几次. 之后, 将晶片放入 3 ml 1 mol/L 的乙醇胺溶液中 30 min. 将固定有亲和素的石英晶片浸入含有生物素修饰的寡核苷酸的缓冲液中, 缓冲液冲洗后, 用于杂交, 具体见图 2.

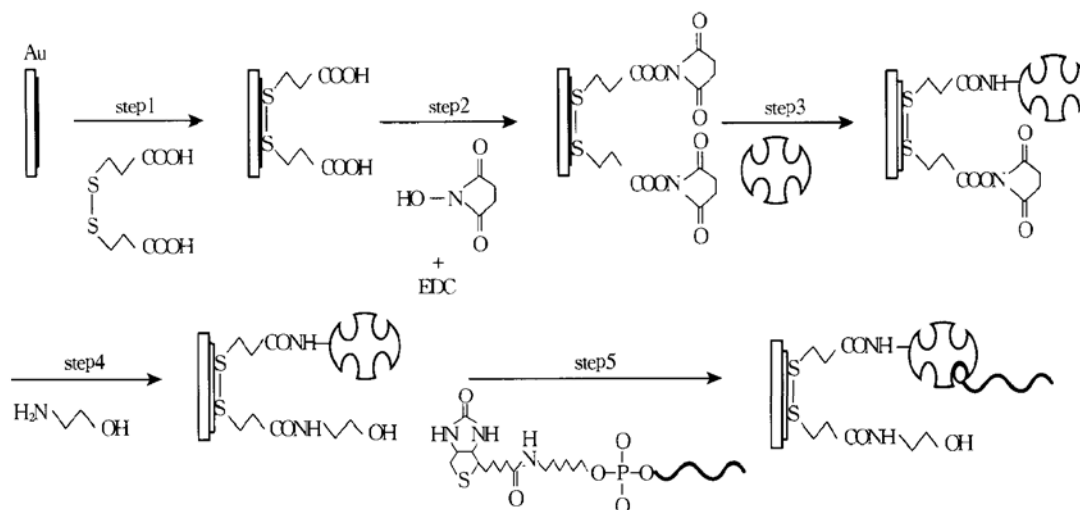


Fig. 2 SEB DNA probe immobilized on Au electrode by using an avidin-biotin interaction

2.3 测定方法

在测定之前, 晶体放在接近容器 2/5 部位, 容

器中放有硅胶, 振荡频率达到基频并稳定, 频率计为 f_1 , 然后, 固化的压电式基因传感器放入含有

样品的 ssDNA 杂交缓冲液中, 2 h 杂交后, 晶体取出来并用同一缓冲液洗, 然后, 用去离子水去除非特异性吸附. 最后, 把晶片放入干燥器, 得到频率为 f_2 , 频率变化 $\Delta f = f_1 - f_2$.

3 实验结果

3.1 压电 DNA 传感器固定化和杂交条件

生物素标记 DNA 探针, 在室温条件下固定化, 固定化时间为 30 min; 在 25~30 °C 条件下进行杂交; 杂交时间 2~7 h; 缓冲液的 pH 为 7.9.

3.2 生物素标记 DNA 探针在电极表面固定化和杂交

3.2.1 动态变化: 本实验采用 10 MHz 的石英谐振器作为敏感元件, 利用生物素修饰的寡核苷酸和 PCR 扩增的 169 bp 的生物素探针作为分子识别元件, 将这两个不同长度的探针通过亲合素-生物素的特异性结合, 固定在金电极上, 然后进行杂交, 其频率变化过程见图 3.

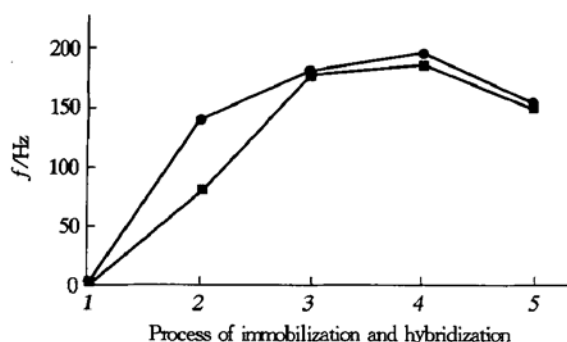


Fig. 3 Immobilization of biotin labeled DNA probe and hybridization

■—■: biotinylated nucleotide; ●—●: 169 bp. 1: original frequency; 2: dispose; 3: avidin; 4: biotin labeled DNA probe; 5: hybridization.

图 3 表明, 电极用 piranha 溶液 ($\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2 = 3:1$) 处理后, 电极上面的杂质被处理掉了, 因此, 电极表面的质量减小, 频率增加; 亲和素组装在电极上后, 电极表面的质量增加, 频率减小; 亲和素和 DNA 探针上的生物素特异性结合后, 电极表面质量进一步增大, 频率进一步减小; DNA 探针和杂交液中的 ssDNA 杂交后, 质量又进一步增加, 频率也进一步减小, 符合 Sauerbrey 方程, 因此, 该实验可以说明, DNA 探针已固定电极上, 且杂交效果明显. 同时也说明了, PCR 扩增的生物素探针比合成寡核苷酸探针固定化量稍大一些, 杂交的效果稍好一些.

3.2.2 静态测定法: 选用 6 片 10 MHz 石英晶体, 将 PCR 扩增的生物素化的 SEB DNA 探针固定在石英谐振器上, 并与互补的 ssDNA 进行杂交, 用网络分析仪测定固定前后的阻抗变化, 结果见表 1.

Table 1 Impedance shift of immobilization and hybridization of SEB DNA probe by PCR

Impedance shift	Golden electrode of crystal quartz					
	1	2	3	4	5	6
$\Delta Q_1/\Omega$	9.187	10.653	10.106	9.233	11.024	9.241
$\Delta Q_2/\Omega$	9.276	10.989	10.436	9.624	11.243	9.684

* ΔQ_1 : impedance shift due to immobilization by biotin labeled DNA probe; ΔQ_2 : impedance shift due to DNA hybridization.

由表 1 可知, 其阻抗在固定和杂交过程中都有变化, 说明生物素标记 DNA 探针已固定在石英谐振器上, 并在石英谐振器的电极上发生杂交反应后.

3.2.3 扫描电子显微镜 (SEM) 下观察电极的形貌: 选择静态测定后的未刨光的石英谐振器, 在 SEM 下观察电极的形貌, 以判断电极上是否有生物素标记的 DNA 探针, 并了解杂交情况. 由图 4 和图 5 可知, 所观察到结果和理论的情况相同.

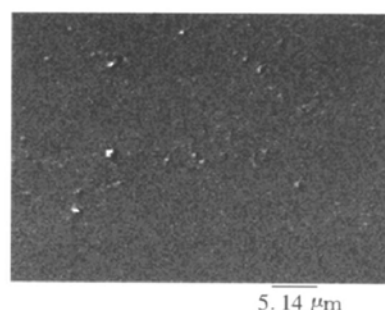


Fig. 4 Surface appearance of the electrode after coated by biotin labeled DNA probe by SEM

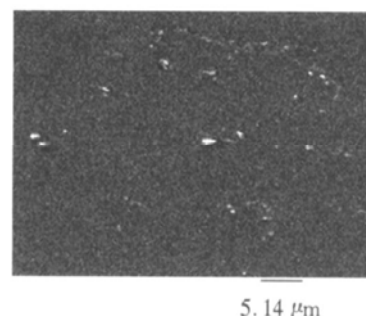


Fig. 5 Surface appearance of the electrode after DNA hybridization by SEM

3.3 固化 ssDNA 敏感膜一致性实验

为了检测固化方法优劣, 采用 3.58 MHz 的石英谐振器, 将生物素标记的 DNA 探针固化在石英谐振器的金电极表面, 和互补的 ssDNA 进行杂交

Table 2 The consistency of immobilization process

Immobilization substance	$\Delta f / \text{Hz}^{1)}$ (inter group)	S (inter group)	$\Delta f / \text{Hz}^{2)}$ (in group)	S (in group)
169 bp ssDNA	128	4.21	121	4.56
Biotinylated nucleotide probe	123	6.21	119	8.45

¹⁾ $n = 6$; ²⁾ $n = 3$.

反应, 进行了批间和批内的实验, 对不同片段成膜一致性进行了检测, 结果见表 2.

由表 2 可知, 在探针固化过程中, 批间比批内的一致性较好, 有可能是电极再生过程中的实验误差引起的; 生物素标记的 169 bp DNA 探针比生物素标记的寡核苷酸固定效果要好.

3.4 压电 DNA 传感器的特异性实验

采用 3.58 MHz 的镀金石英晶体片, 将含有 SEB 生物素标记的两个不同片段 DNA 探针固化在金电极上, 杂交液中分别加入 1000A (SEA)、1093C (SEC)、494D (SED) 等标准菌株的 ssDNA, 进行杂交, 结果见表 3.

Table 3 The specificity of piezoelectric DNA sensor

f / Hz	Golden electrode of crystal quartz							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Original frequency	3 582 442	3 582 231	3 583 968	3 581 622	3 581 172	3 580 541	3 582 654	3 580 273
Immobilized frequency	3 582 291	3 582 079	3 583 806	3 581 469	3 581 271	3 580 381	3 582 100	3 580 110
Hybridization frequency	3 582 289	3 582 081	3 583 809	3 581 471	3 581 268	3 580 379	3 582 102	3 580 111

始频和固化频率两组数据经过统计学分析, 这两组数据在统计学上有显著性差异. 说明生物素标记的 DNA 探针固化到金电极上. 固化频率和杂交频率两组数据经过 SAS 软件分析, $P = 0.6622 > 0.05$, 说明两组数据没有统计学上的差异. 说明这两个探针在金电极上均没有特异性杂交反应. 而杂交液中分别加入 216B (SEB) 标准菌株的 ssDNA, 固化频率和杂交频率两组数据 ($P < 0.05$, 表略) 有统计学上的差异. 表明这两个探针在金电极上有特异性反应. 这个实验表明该传感器的特异性较好.

3.5 压电 DNA 传感器的重复使用次数

固化在金电极上的生物素标记 DNA 探针, 与杂交液中的 SEB 的 ssDNA 进行杂交, 将杂交反应过石英晶体片的金电极放入 0.25 mol/L 的 HCl 中 15 min, 0.5 mol/L 的 NaOH 中 30 min 进行洗脱后再生, 传感器电极可以重复使用, 结果见图 6.

用 ABS 固化技术制作的传感器, 用 PCR 扩增的方法制作的生物素探针固化在金电极上, 传感器可以重复使用, 图 6 表明, 前 4 次的一致性较好, 用过 8 次以后, 生物素标记的 DNA 活性酸的活性殆尽, 而生物素标记的寡核苷酸, 固化在电极上制作的传感器, 可以重复使用 3 次, 第 5 次以后, 频移下降较快. 图 6 也说明, 用这两个探针制作的传

感器, 使用效果都比较好, 但 PCR 扩增制备探针比较方便, 且制备的量较大, 成本低, 因此, 使用生物素标记的 169 bpDNA 探针制作传感器的研究多一些.

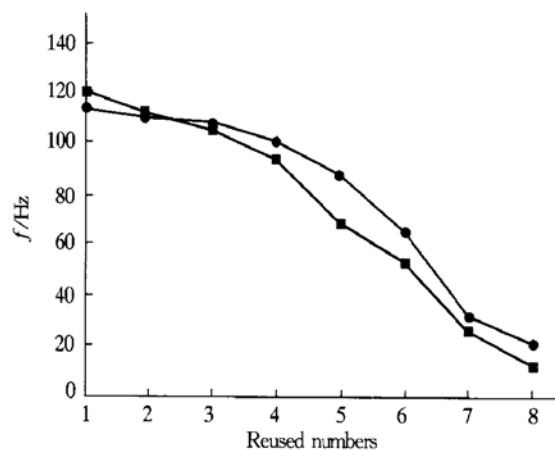


Fig. 6 Reused numbers of the piezoelectric DNA sensor

● — ●: 169 bp ssDNA; ■ — ■: biotinylated nucleotide.

3.6 传感器的检测曲线

将生物素标记的 169 bp DNA 探针固化在金电极上, 和 0、0.1 mg/L、1 mg/L、10 mg/L、100 mg/L 等不同浓度的互补 ssDNA 进行杂交, 结果见图 7.

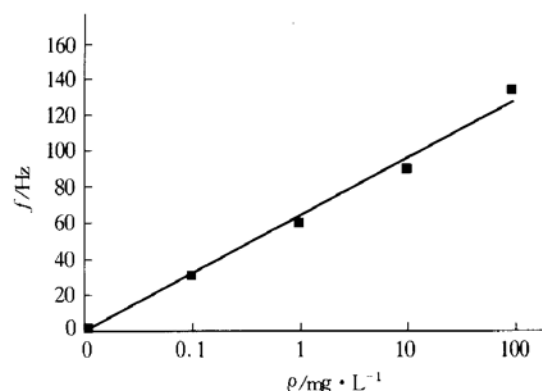


Fig. 7 Response curve on ssDNA concentration in hybridization solution

$$y = 32.6x - 34.4; r^2 = 0.9903.$$

由图 7 可知, 杂交浓度和频移呈良好的线性关系。

3.7 样品检测和方法比较

本实验分别采用 PCR 法、斑点杂交法和固化 169 bp 的生物素标记 DNA 探针制作传感器法对 10 个临床样品进行检测, 采用 PCR 法^[7]、斑点杂交法^[11]和传感器法检测出阳性菌株为 8 株, 2 株为阴性 (说明这 2 株菌不含有产生 SEB 的基因), 几种检测方法的结果是一致的, 说明 169 bp 的生物素标记 DNA 探针制作传感器用作基因检测是可行的。从实验可知, PCR 方法快速、灵敏。压电 DNA 传感器检测样品虽然需 2 h 左右也可以定性检测, 但到 7 h 后响应曲线才能够趋于饱和, 另外, 传感器的灵敏度没有 PCR 法高。但是压电 DNA 传感器法和传统的斑点杂交相比较, 压电 DNA 传感器法省去了预杂交等步骤, 因此比较省时、操作方法简单、灵敏度和斑点杂交相当, 具有一定优越性, 是基因诊断和分离的方法之一, 也是基因检测的发展方向。

4 讨 论

4.1 乙醇胺封闭作用

本研究采用 3, 3'-二硫代丙酸的巯基在金表面形成的单分子自组装层, 亲和素-生物素作为固定生物识别分子的桥, 这种固定化方法在生物传感器研究中倍受重视。本研究为了避免残余偶联剂与单分子层的羧基形成的活泼酯基团与后续试剂发生反偶联, 将固化有亲和素的电极, 浸入乙醇胺溶液中, 室温放置 30 min, 后取出, 使得经过乙醇胺处理后, 封闭了活泼酯基团, 消除一些实验误差。

4.2 PCR 产物的纯化问题

在固化探针时, 利用纯化过的 PCR 产物固化效果较好, 因为不经过纯化的 PCR 产物中含有缓冲液, 如果直接固定化, 就会改变固定化离子浓度, pH 值等条件, 因此, 固化效果不太好, PCR 最好经过纯化后再作固化用。

4.3 传感器的特异性问题

因为 PCR 扩增生物素标记的特异性 DNA 探针特异性比较好, 生物素标记的寡核苷酸也是经过计算机模拟设计出来的, 和葡萄球菌肠毒素 (SE) 的其他型基因无交叉的互补序列。从分子生物学的理论上讲, 这两个生物素标记的片段, 特异性都较好, 实验也证明了这一点。

4.4 亲和素-生物素系统的 DNA 探针固定化方法

生物敏感膜的制备是生物传感器研制过程中一个关键环节, 也是最为重要的技术之一。以往的物理或化学吸附、涂层和聚合等常规的制膜方法不能完全控制分子取向和排列, 不易得到高度的有序膜。而通过亲和素-生物素的特异性结合, 在一定范围内敏感膜可制成有序排列的层状结构, 使得制作的传感器一致性较好。而且, 亲和素-生物素偶联固化 ssDNA, 具有较高的识别灵敏度, 这可能与亲和素-生物素系统能提供有效的杂交空间有关。另外, BAS 具有高稳定结合性等特点, 在压电 DNA 传感器研究中, 应用 BAS 可以提高生物物质或体系的固定化效率。

参 考 文 献

- 1 李成文. 生物素亲和素的免疫化学. 生物化学与生物物理进展, 1990, 17 (1): 27~29
Li C W. Prog Biochem Biophys, 1990, 17 (1): 27~29
- 2 Rickert J, Brecht A, Copel W. QCM operation in liquids: constant sensitivity during formation of extended protein multilayers by affinity. Anal Chem, 1997, 69 (7): 1441~1448
- 3 Masson M, Yun K, Haruyama T, *et al.* Quartz crystal microbalance bioaffinity sensor for biotin. Anal Chem, 1995, 67 (13): 2212~2215
- 4 Hagiwara H, Nagasawa T, Lodhiet M. Affinity chromatographic purification of bovine lung endothelin receptor using biotinylated endothelin and avidin agarose. J Chromatogr, 1992, 597: 331~334
- 5 Chen L, Martin B, Rechnitz G A. Microtiter plate binding assay for cholinergic compounds utilizing the nicotinic acetylcholine receptor. Anal Chem, 1992, 64 (23): 3018~3023
- 6 Vaknin D, Als Nielsen M, Losche M. Recognition processes at a functionalized lipid surface observed with molecular resolution. Biophys J, 1991, 60: 1545~1552
- 7 高志贤, 晁福寰. 聚合酶链反应检测 SEB 基因. 中华预防医学杂志, 2000, 34 (5): 303~305

- Gao Z X, Chao F H. Journal of Preventive Medicine, 2000, **34** (5): 303~ 305
- 8 Yoshio O, Kenichi N, Yukio S, *et al.* Kinetic studies of sequence-specific binding of GCN4-BZIP peptides to DNA strands immobilized on a 27 MHz quartz crystal microbalance. Biochemistry, 1998, **37** (16): 5666~ 5672
- 9 Newton C F, Richard D C, Zhang P, *et al.* QCM response to solvated, tethered macromolecules. Anal Chem, 1998, **70** (14): 2876~ 2880
- 10 Sauerbrey G. Use of quartz vibrator for weighing thin films on a microbalance. Z Phys, 1959, **155**: 206~ 209
- 11 高志贤, 晁福寰. 生物标记的 DNA 探针检测 SEB 基因. 中华医学检验杂志, 1999, **22** (5): 281~ 283
- Gao Z X, Chao F H. Chinese Journal of Medical Laboratory Sciences, 1999, **22** (5): 281~ 283

The Studies on Biotin-avidin Indirect Conjugated Technology for Piezoelectric DNA Sensor^{*}

GAO Zhì-Xian^{**}, CHAO Fu-Huan, WANG Hong-Yong, FANG Yan-Jun, NING Bao-An
(Institute of Hygiene and Environmental Medicine, Academy of Military Medical Science, Tianjin 300050, China)

PAN Hai-Feng, ZHU Hui-Zhong

(Department of Precision Instruments and Mechanology, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract A piezoelectric DNA sensor based on self-assembled monolayer technology was developed. In the experiment, 3, 3'-dithiopropionic acid was applied to immobilize DNA, 1-ethyl-3-[3-(dimethylamino) propyl] carbodiimide (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS) can coat avidin on gold electrode, and then avidin can combine to different segment (25-mer biotinylated oligonucleotide and 169 bp biotinylated DNA probe by PCR) nucleotide on gold electrode surface. The consistency and speciality of the piezoelectric DNA sensor adopted above immobilization method was well. The sensor can be reused by electrode regeneration.

Key words piezoelectric DNA sensor, biotin-avidin system, self-assembled monolayers

^{*} This work was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (39970644) and The Tianjin Natural Science Foundation (003608111).

^{**} Corresponding author. Tel: 86-22-84655403, E-mail: gaozhx@hotmail.com

Received: November 19, 2001 Accepted: December 25, 2001