

电场驱动微悬臂生物传感器及对 DNA 的快速、高灵敏度检测*

张志祥 李民乾**

(中国科学院上海应用物理研究所, 中国科学院核分析重点实验室, 上海 201800)

摘要 微悬臂阵列传感器在生物检测方面具有快速、痕量和非标记的特性. 我们以镀金并在其上固定了 DNA 探针的微悬臂为正极, 在靶杂交液槽内引入另一电极作为负极, 构成电场驱动微悬臂 DNA 生物传感器. 对该传感器系统施加静电场, 驱动 DNA 分子朝正极迁移, 使溶液中的 DNA 分子富集在微悬臂上, 促进 DNA 分子的杂交. 结果表明: a. DNA 在微悬臂上的杂交时间仅需 3 min, 加快了微悬臂生物传感器对 DNA 分子的检测速度; b. 提高了微悬臂生物传感器的灵敏度, 可以检测到皮克级的 DNA 分子.

关键词 微悬臂, 生物传感器, 电场, 检测灵敏度

学科分类号 Q61

近年来, 包括微悬臂阵列在内的微阵列技术在药物筛选、免疫分析、基因和蛋白质等生化分析方面^[1-4]得到广泛的应用. 但其中大部分分析方法主要依靠荧光表征或者放射标记的手段, 这既费时又费力. 而非标记检测技术既能迅速分析生物样品, 又可做到在线监测和避免标记方法对检测结果的干扰, 是现代生物分析科学发展的趋势, 也是将来生物研究依赖的主要工具之一. 具有高检测灵敏度的微悬臂阵列传感器技术在快速、痕量和非标识生物检测方面显示了众多的优越性^[5-9]. 但在应用中检测灵敏度往往不能满足实际要求: 如对 DNA 的检测, 在 75 nmol/L 浓度下可以检测到飞摩尔级的分子数, 浓度低于 nmol/L 时则无能为力^[9]. 另外, 针对 DNA 的微悬臂传感器, 虽然微悬臂本身对质量变化反应很快, 但是, 由于杂交时间太长, 使得传感器总的反应时间仍然很慢, 在低的样品浓度下, 往往需要 2~12 h, 这大大阻碍了微悬臂的实际应用.

在加快检测速度方面, Nanogen 公司应用溶液中带电荷的分子在电场的作用下, 朝正极或者负极泳动原理, 在 Nanochip 上施加电场来提高 DNA 的检测速度和检测的忠实性, 结果可以做到对 DNA 分子单点突变检测并缩短了检测时间^[10].

本文提出了能大大提高检测灵敏度的电场驱动微悬臂生物传感器技术, 并对 DNA 样品进行测试. 我们根据 DNA 分子在电场驱动下, 在溶液中朝正极泳动的原理和微悬臂表面结合生物分子后引起共

振频率变化的原理, 在 DNA 杂交过程中, 以固定了 DNA 探针的微悬臂做为 DNA 杂交溶液槽的正极, 在溶液槽内引入另一电极负极, 施加静电场, 利用原子力显微镜的激光束对 DNA 杂交前后微悬臂的共振频率进行检测, 达到了加快检测速度和提高检测灵敏度的目的. 结果表明: a. 电场驱动微悬臂生物传感器对 DNA 分子检测灵敏度从 $\mu\text{g/L}$ 级提高到 ng/L 级; b. 检测时间从几小时缩短到 3 min.

1 材料和方法

1.1 仪器和材料

1.1.1 仪器. 原子力显微镜为 Seiko 公司的 SPA 3800N, 函数发生器为 Agilent 公司的 Agilent 33120, 表面镀金、弹性系数为 0.03 N/m 的氮化硅微悬臂阵列 (每一列阵含 4 根微悬臂, 每根微悬臂长 500 μm , 宽 100 μm , 厚 1 μm , 中心间距为 280 μm), 由复旦大学微电子系吴宪平教授提供.

1.1.2 试剂. 本实验中用了三类单链 DNA 片段. 作为样品检测探针氨基标记 ssDNA 探针 1: 5' Amino-ACG TGG CAT GCT GGC CAC CGG C; 作为对比参照探针 2: 5' Amino-TGA GCA CAT CCC

*上海市科委纳米专项 (0259 nm 087) 资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 021-59554623, Fax: 021-59552394

E-mail: liminqian@sinap.ac.cn

收稿日期: 2005-02-21, 接受日期: 2005-03-14

ACG CCT TAC G; 与探针 1 配对的靶 DNA: GCC GGT GGC CAG CAT GCC ACG T. 上述 DNA 片段以及杂交液 (50% 甲酰胺, $6\times$ 标准 SSC, 0.1% SDS, $5\times$ Denhardt 和 100 mg/L 鲑鱼精 DNA) 购自上海生物工程公司. 1,4-二(2,3-环氧丙基)丁二醚 (4-butnaediol diglycidyl ether, BDGE), 4-二甲氨基吡啶 (4-dimethylaminopyrimidine, DMAP), N,N-二甲基甲酰胺 (N,N-dimethylformamide, DMF) 和 2-氨基乙硫醇购自 Sigma 公司. 其他试剂均为分析纯. 所用水都经过 Millipore Q (Millipore Co.) 纯化.

1.2 方法

1.2.1 DNA 探针微悬臂表面的固定. 将微悬臂放置在 NaOH (1 mol/L) 溶液中浸泡 15 min, 水洗后放置在 HCl (1 mol/L) 中 5 min, 依次用水和乙醇洗, 真空抽干, 充入氮气, 立即浸泡到 10 mmol/L 的 2-氨基乙硫醇水溶液中, 放置过夜, 依次用水、乙醇洗, 真空中抽干后, 在金表面制备出一层含氨基的自组膜. 然后放置在 1% BDGE 的 DMF 溶液中反应 2 h, 乙醇洗, 真空抽干, 通过 BDGE 与氨基反应, 进而在表面生成一层可以和 Amino-ssDNA 上氨基反应的环氧乙烷基团. 将微悬臂浸泡在 Amino-ssDNA 水溶液 (60 mg/L Amino-ssDNA, 1 g/L DMAP) 中, 反应 2 h 后, 杂交液、水洗, 用滤纸小心吸干, 得到固定有 DNA 探针的微悬臂.

1.2.2 微悬臂表面 DNA 杂交. 将微悬臂放置在含不同浓度靶 DNA 的杂交液中, 杂交时, 在 42℃ 反应 12 h 后, 用杂交液和水洗、滤纸小心吸干.

1.2.3 微悬臂生物传感器的再生. 将杂交后的微悬臂浸泡在杂交液中, 60℃ 放置 30 min 后, 水洗并用滤纸小心吸干.

1.2.4 电场驱动微悬臂表面 DNA 杂交. 将微悬臂放置在含不同浓度靶 DNA 的杂交液中, 杂交时, 在微悬臂模块和液体槽之间用 Agilent 33120 施加 1 V 的静电场, 在 42℃ 反应 3 min 后, 用杂交液和水洗、用滤纸小心吸干.

1.2.5 频率检测. 用原子力显微镜激光束分别对固定探针的微悬臂阵列, 在杂交反应前后的共振频率进行检测.

2 结 果

2.1 杂交反应

为了检验微悬臂生物传感器的特异性, 我们对微悬臂阵列其中的一根固定对照探针 2 作为对照臂, 探针 2 与溶液中靶 DNA 序列不匹配. 其他微

悬臂固定检测探针 1. 修饰后的微悬臂阵列与含 3.0 mg/L 靶 DNA 的杂交液杂交以及在 60℃ 下使用杂交液对微悬臂再生, 检测结果表明: 固定探针 1 微悬臂的频率向高频发生迁移, 而固定探针 2 的则没有变化.

微悬臂的共振频率 f_i 以及弹性系数 K_i 可由如下计算获得^[1]:

$$f_i = (2\pi)^{-1} (E_i / \rho_i)^{-1/2} T_{\text{cant}}^2 L_{\text{cant}}^2 \quad (1)$$

$$K_i = E_i T_{\text{cant}}^3 W_{\text{cant}} (4L_{\text{cant}}^3)^{-1} \quad (2)$$

其中 E_i 、 ρ_i 、 T_{cant} 、 L_{cant} 和 W_{cant} 分别为微悬臂的杨氏模量、密度、厚度、长度和宽度, m_i 为微悬臂在杂交过程中所捕获 DNA 的质量. 微悬臂结合物质后, E_i 和 ρ_i 会发生变化. 联合公式(1)和(2), 可得到:

$$f_i = (f_0^2 K_0 + (16\pi^2)^{-1} m_i T_{\text{cant}}^2) K_i^{-1/2} \quad (3)$$

$$\Delta f = f_i - f_0 \quad (4)$$

公式(3)中 m_i 、 K_0 、 f_0 和 Δf 分别代表微悬臂上结合靶分子的质量、固定探针后的弹性系数、共振频率和杂交反应前后共振频率的变化. 可以看出 f_i 与质量 m_i 正相关, 与 K_i 负相关. 在整个微悬臂都固定 DNA 探针的情况下, 结合靶分子的量会导致 K_i 的变化. 在本实验中, 整个微悬臂都由探针进行了修饰, 可以看出在不加电场的情况下靶杂交液浓度在 3.0 mg/L 时, 杂交后微悬臂的共振频率升高 1.2 kHz, 而在浓度为 300 $\mu\text{g/L}$ 时, 微悬臂结合靶 DNA 分子数少, 引起弹性系数 K_i 和结合质量的变化小, 导致共振频率的变化小.

将杂交过的微悬臂放置在杂交液中, 60℃ 变性后, 结果表面微悬臂阵列的共振频率又恢复到固定探针后的共振频率, 说明微悬臂通过再生可以重复使用.

2.2 电场驱动 DNA 杂交

ssDNA 分子带负电荷, 在电场的作用下, 向正极方向移动, 并富集在电极的表面而维持较高的浓度. 在电驱动的情况下, 靶 DNA 浓度在 30 $\mu\text{g/L}$ 时, 共振频率升高达 1.2 kHz, 在 300 ng/L 可以达到 0.2 kHz 共振频率位移产生 (图 1). 相比不加电场的情况下, 靶 DNA 浓度在 3.3 mg/L 时, 共振频率升高达 1.2 kHz, 而在 300 $\mu\text{g/L}$ 时, 共振频率升高仅 0.2 kHz (图 1). 对同一微悬臂使用原子力显微镜进行共振频率检测, 在多次测量中, 频率变化小于 0.1 kHz, 可以推断在加电场的情况下, 微悬臂对 DNA 的检测限可以达到 300 ng/L. 实验表明: 在不

加电场的情况下, DNA 杂交需 2~12 h; 而在电场驱动的情况下, 杂交在 3 min 时, 频率的迁移已经达到 1.2 kHz, 而在 5 min 时, 频率的迁移并没有增加, 表明反应在 3 min 时就已达到饱和, 这大大缩短了检测时间。

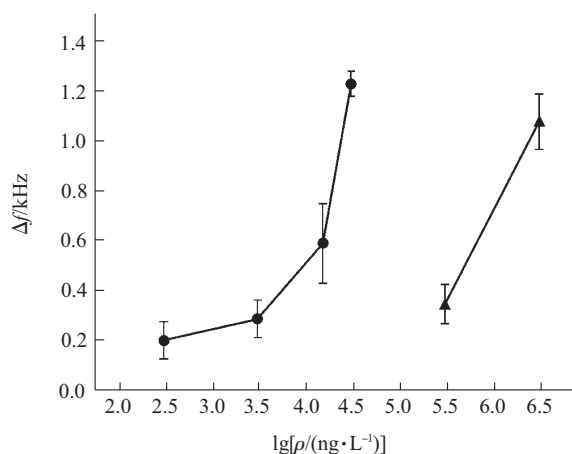


Fig.1 Comparison of resonance-frequency shifts of DNA hybridization under electric field (●—●) and electric field control (▲—▲)

Data are shown for the hybridization at given concentration. The hybridization proceeds for 3 min under electric field and for 12 h under electric field control. The shift is 1.2 kHz under electric field in 30 μg/L of target DNA solution, but the shift is 1.09 kHz under electric field control in 3.0 mg/L of target DNA solution. The detection sensitivity reaches to 300 ng/L under electric field.

3 讨 论

我们通过对微悬臂的修饰, 在微悬臂列阵表面上固定两种不同的 DNA 探针. 在检测杂交反应中, 靶 DNA 分子特异地结合在和其配对的微悬臂上产生明显的共振频率位移 (Δf), 而和其序列不匹配的微悬臂上则没有信号或信号很小. 表明微悬臂生物传感器对被检验的生物样品有特异性. 同时, 微悬臂的再生反应表明, 微悬臂生物传感器可以重复使用并可以做到在线检测。

在一般情况下, 微悬臂对 DNA 的杂交反应需要 2~12 h, 这降低了检测的效率, 使其很难进行实

时监测. 通过对微悬臂施加电场, 使靶分子迅速地富集微悬臂的表面, 使其表面的靶分子维持在较高的浓度, 既提高了反应的速度 (仅需 3 min), 又提高了微悬臂传感器的灵敏度近 1 000 倍, 使其检测限达到 300 pg 水平。

参 考 文 献

- 1 Cronin M T, Pho M, Dutta D, *et al.* Utilization of new technologies in drug trials and discovery. *Drug Metab Dispos*, 2001, **29** (4): 586~590
- 2 Gosalia D N, Diamond S L. Printing chemical libraries on microarrays for fluid phase nanoliter reactions. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2003, **100** (15): 8721~8726
- 3 Scorilas A, Bjartell A, Lilja H, *et al.* Streptavidin-polyvinylamine conjugates labeled with a europium chelate: applications in immunoassay, immunohistochemistry, and microarrays. *Clin Chem*, 2000, **46** (9): 1450~1455
- 4 Kondo Y, Shen L, Yan P S, *et al.* Chromatin immunoprecipitation microarrays for identification of genes silenced by histone H3 lysine 9 methylation. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2004, **101** (19): 7398~7403
- 5 McKendry R, Zhang J, Arntz Y, *et al.* Multiple label-free biodetection and quantitative DNA-binding assays on a nanomechanical cantilever array. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2002, **99** (15): 9783~9788
- 6 Baselt D R, Lee G U, Colton R J. Biosensor based on force microscope technology. *J Vac Sci Technol B*, 1996, **14** (2): 789~793
- 7 Hansen K M, Ji H-F, Wu G H, *et al.* Cantilever-based optical deflection assay for discrimination of DNA single-nucleotide mismatches. *Anal Chem*, 2001, **73** (7): 1567~1571
- 8 Fritz J, Baller M K, Lang H P, *et al.* Translating biomolecular recognition into nanomechanics. *Science*, 2000, **288** (14): 316~318
- 9 Battiston F M, Ramsryer J-P, Lang H P, *et al.* A chemical sensor base on a microfabricated cantilever array with simultaneous resonance-frequency and bending readout. *Sens Actuators B*, 2001, **77** (1): 122~131
- 10 Evans J G, Lee-Tataseo C. Determination of the factor V Leiden single-nucleotide polymorphism in a commercial I by use of NanoChip microelectronic array technology. *Clin Chem*, 2002, **48** (9): 1406~1411
- 11 Chen G Y, Thundat T, Wachter E A, *et al.* Adsorption induced surface stress and its effects on resonance-frequency of microcantilever. *J Appl Phys*, 1995, **77** (8): 3618~3622

Electrostatic Microcantilever Array Biosensor and Its Application in DNA Detection*

ZHANG Zhi-Xiang, LI Mian-Qian**

(Key Laboratory of Nuclear Analysis, Shanghai Institute of Applied Physics, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China)

Abstract Microcantilever array biosensor shows peculiarities of high speed, trace detection and label-free in bioanalysis. A method to increase the detection sensitivity and to speed up analysis of microcantilever array biosensor is reported. The gold covered microcantilever array immobilized by DNA probes is applied as a microcantilever array biosensor with electrostatic field. Microcantilever array is acted as anode in hybridization solution cell where DNA molecules are removed to and congregated around anode, so the DNA hybridization is enhanced. The data demonstrated: (1) the time of DNA hybridization on the cantilever system driven by direct electric field was no more than 3 min; (2) the detection sensitivity was improved from 30 $\mu\text{g/L}$ to 300 ng/L level.

Key words microcantilever, biosensor, electrostatic field, sensitivity

*This work was supported by a grant from Shanghai Nanotechnology Promotion Center (0259nm087).

**Corresponding author . Tel: 86-21-59554623, Fax: 86-21-59552394, E-mail: liminqian@sinap.ac.cn

Received: February 21, 2005 Accepted: March 14, 2005