

(MARs) 研究进展. 细胞生物学杂志, 1995, 17 (2): 54~ 59

4 Bode J, Maass K. Chromatin domain surrounding the human interferon β gene as defined by scaffold-attached region. Biochemistry, 1988, 27 (13): 4706~ 4711

5 Bode J, Kohwi Y, Dickinson L *et al.* Biological significance of unwinding capability of nuclear matrix-associating DNAs. Biochemistry, 1992, 255 (5041): 195~ 197

6 McKnight R A, Shamay A, Sankaran L *et al.* Matrix-attachment regions can impart position-independent regulation of a tissue-specific gene in transgenic mice. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89 (8): 6943~ 6947

7 Xu M, Hammer R E, Blasquez V C *et al.* Immunoglobulin k gene expression after stable integration. (II) Role of the intronic MAR and enhancer in transgenic mice. J Biol Chem, 1989, 264 (35): 21190~ 21195

8 Blasquez V, Xu M, Moses S C *et al.* Immunoglobulin k gene expression after stable integration. (I) Role of the intronic MAR and enhancer in plasmacytoma cells. J Biol Chem, 1989, 264 (35): 21183~ 21189

9 Hyttinen J M, Peura T, Tolvanen M. Generation of transgenic dairy cattle from transgenic analyzed and sexed embryos produced *in vitro*. Bio/Technology, 1994, 12 (3): 606~ 608

10 Burdon T, Sankaran L, Wall R J *et al.* Expression of a whey acidic protein transgene during mammary development. J Biol Chem, 1991, 266 (11): 6906~ 6914

11 Pienta K J, Partin A W, Coffey D S. Cancer as a disease of DNA organization and dynamic cell structure. Canaer Res, 1989, 49 (5): 2525~ 2532

12 Kay V, Bode J. Binding specificity of a nuclear scaffold: supercoiled, single-stranded, and scaffold-attached region

DNA. Biochemistry, 1994, 33 (1): 367~ 374

13 Klehr D, Maass K, Bode J. Scaffold-attached regions from the human interferon β domain can be used to enhance the stable expression of genes under the control of various promoters. Biochemistry, 1991, 30 (5): 1264~ 1270

14 Cockerill P N, Garrard W T. Chromosomal loop anchorage of the kappa immunoglobulin gene occurs next to the enhancer in a region containing topoisomerase II sites. Cell, 1986, 44 (2): 237~ 282

MAR: A New Element of Gene Expression in Transgenic Animal. LU Yifan, DENG Jixian, XIAO Chengzu, MA Qingjun (*Institute of Biotechnology, Academy of Military Medicine Sciences, Beijing 100071, China*).

Abstract Matrix-attachment regions (MARs) has been identified to buffer the effects of flanking chromatin in stably transfected cell lines. This gives new area in transgenic animal gene expression. Some researchs on MARs in transgenic animal and possible mechanism are reviewed. It suggests that MARs can establish independent genetic domains and have important significance on increaseing gene expression in transgenic animal.

Key words MAR, gene expression, transgenic animal

DNA 生物传感器进展

翟俊辉 崔 红 杨瑞馥

(军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京 100071)

摘要 近几年来, 酶传感器、免疫传感器及微生物传感器等发展较为成熟, 而 DNA 生物传感器的研究相对较少. 文章从核酸杂交的原理出发介绍了 DNA 生物传感器的工作原理, 举例说明了电化学、光学和声学等几种典型的 DNA 生物传感器, 指出了其固有的优缺点, 肯定了 DNA 传感器发展前景.

关键词 DNA 生物传感器, 核酸杂交, 探针, 压电晶体, 光纤

生物传感器 (biosensors) 的产生在医药卫生、食品检验和环境监测等各个领域引起了一场革命, 其简单、快速和准确的特点打破了以往诸多分析手段^[1]. 这种优越性使人们的

注意力越来越集中于生物传感器的研究, 并同时推动着它们的发展. 其中发展较快的有酶传感器、免疫传感器和微生物传感器等, 酶传感

器已经发展得相当成熟,许多产品已经走向商品化阶段,各种各样血糖检测仪的出现就是其中较为成功的例子之一.相对来说 DNA 生物传感器 (DNA biosensor) 的研究较少. DNA 杂交所严格遵守的碱基配对原则奠定了 DNA 生物传感器的特异性,同时核酸杂交的缓慢动力学也似乎阻碍了它的迅速发展.

1 概 述

DNA 生物传感器设计的依据就是核酸杂交动力学,因此确切来说它应该是核酸杂交生物传感器 (nucleic acid hybridization biosensor) 的简称.每个种属生物体内都含有其独特的核酸序列,因此检测核酸关键性策略是设计一段寡核苷酸探针.探针一般由 10~30 个核苷酸组成,是一段单链核酸分子,能够专一地与特定靶序列进行杂交^[2]从而检测出特定的生物种属.杂交过程具有很高的特异性和敏感性,这是核酸检测研究的基础,也是设计 DNA 生物传感器首要的和基本的条件.真正的 DNA 生物传感器应该具备这样一种换能器:检测杂交反应应该在其上直接完成,并且换能器能将杂交过程所产生的变化转变成电信号.根据杂交前后电信号变化量,从而推断出被检 DNA 的量.因换能器和接受器种类不同,所以就可以构成不同类型的 DNA 生物传感器.

2 DNA 生物传感器的类型

DNA 生物传感器根据选用介质及换能器种类可分为电化学 (electrochemical)、光学 (optical) 和压电晶体 (piezoelectric) 等几大类.

2.1 电化学 DNA 生物传感器

电化学 DNA 生物传感器是根据固定在电极上的寡核苷酸与溶液中互补核酸杂交时,能够引起电极上电流值变化这种原理设计的^[3,4].具体来说就是将核酸探针共价结合在伏安计电极表面,探针与互补序列杂交后会形成双链分子.在加入氧化还原活化金属/多聚吡啶络合物后,双链 DNA 分子会选择性地与

之结合,随后引起电极表面 DNA 层附近金属络合物浓缩,从而导致伏安计峰值电流增加 (比单链时的值要大).这样就可以通过差值来检测互补核酸片段了.

Millan 等^[5]于 1994 年又将这一技术作了改进,他们选用经有机酸修饰后的碳糊电极 (carbon paste electrodes) 作为共价结合探针的固相支持物,待探针共价联接到电极上后,在溶液中可以观察到峰值电流比单独的碳糊电极有所增加.然后这些电极浸在溶液中与互补序列杂交,又可观察到峰值电流的进一步增加.结果表明在低离子强度下 (20 mmol/L NaCl) 杂交进程缓慢 (≥ 1 h),高离子强度 (0.5 mol/L NaCl) 下可发生快速杂交 (≤ 10 min).在高离子强度杂交情况下,此传感器可检测少至 2.5 ng 靶核苷酸,相当于 250 pg 典型的 400 bp PCR 产物.此种 DNA 生物传感器还被应用到囊性纤维化 $\Delta F508$ 序列缺失突变检测中,并取得了较好结果.电极经热去离子水浸泡后还可进行 2~3 轮杂交^[5],但经 8 mol/L 尿素和 6 mol/L 盐酸胍处理后便丧失了再生性.

从以上结果可以看出,电化学 DNA 生物传感器具有响应快速 (10 min~1 h) 和特异敏感的特点,同时也不需要特殊仪器,一只伏安计即可.但其电极再生性较差,重复利用度低.

2.2 光学 DNA 生物传感器

根据所选光学元件和检测器材的不同,光学 DNA 生物传感器也可分成许多种类.制造这类传感器通常所遇到的困难是如何将 DNA 固定在光学元件上和怎样使检测时光吸收达到最大值,我们可以从以下几个例子中看到这个问题是如何被解决的.

2.2.1 荧光型: Piunno 等^[6,7]选择了石英光纤 (optical fiber) 作为光学元件,光纤经过活化后,在其表面连接上长链脂肪酸分子,后者末端可连接上脱氧胸腺嘧啶衍生物.随后将光纤置入固相 DNA 合成仪中,在光纤表面脂肪酸分子末端的胸腺嘧啶基础上直接合成含有 20 个胸腺嘧啶的寡核苷酸 (dT₂₀).这样探针

就被直接固定在光纤表面。

随后将光纤置于杂交液中, 与其互补序列(含有 20 个腺嘌呤的寡核苷酸 dA₂₀) 进行杂交。完毕后注入溴化乙锭 (EB) 染色, 再用 Ar⁺ 激光器照射, 激发荧光用摄像器材和微机进行分析。此法能够检测出 86 μg/L 的核酸, 一轮杂交大约需要 46 min。光纤用热缓冲液洗去 EB 和另一条链后还可重复使用 5 次左右^[6,7]。贮存一年后光纤仍可使用。

2.2.2 拉曼光谱型: 拉曼光谱 (Raman spectroscopy) 是化学分析中一个强有力的工具, 因为它需要较昂贵的设备并且敏感性低, 所以应用受到了限制。只从人们发现某种化合物吸附到金属表面可以增强拉曼效率时, 这种技术又赢得了人们的广泛兴趣^[8]。用这种技术对基因探针进行标记, 就可以得到表面增强拉曼基因探针 (surface-enhanced Raman gene probes, SERG probes)。目的核酸固定在硝酸纤维素膜上, 加入 SERG 探针, 过夜杂交后洗去未结合探针, 用光纤、激光器、摄像器材和微机分析拉曼光谱就可以得出结论^[8]。这种技术分析核酸需要的时间较长 (约 15 h), 并且所需设备较昂贵复杂, 所以可行性较差。

2.2.3 共振镜型: Watts 等^[9]通过链霉亲和素-生物素系统将探针标记在一种光学传感器-共振镜 (resonant mirror) 上, 将其浸入到含有靶核酸的杂交液中, 经过 15 min 杂交后检测其共振频率发生的变化, 从而推断出被检核酸量。大约每平方毫米传感器表面可以检测到 263 pg 核酸, 杂交耗时较低 (15 min), 传感器也可重复使用, 但所需设备较复杂。

2.2.4 生物大分子相互作用分析 DNA 生物传感器: 传感器芯片 SA5 (sensor chips SA5) 被选用作生物大分子相互作用分析 (biomolecular interaction analysis, BIA) 的核心元件^[14], 同样利用链霉亲和素-生物素系统将 69 bp 寡核苷酸连接在传感器表面, 然后用 23 bp 小段探针与之杂交, 在杂交发生过程中会伴有共振单位 (resonance unit, RU) 的变化。具体来说, 杂交未发生时, RU 基底值为 15 000, 杂

交液注射到传感器表面约 120 s 后, RU 值上升至 17 000 并维持这个高度约 500 s。据此可对核酸进行定量分析。作者还利用此传感器对 DNA 连接、链分离、聚合反应和酶切等操作过程进行监控, 结果表明一系列 DNA 操作均能在 RU 值上得到不同程度的反映^[14]。传感器经处理后可以重复使用, 检测过程所需时间较短 (5~20 min), 真正实现了所谓的实时 (real-time) 检测^[14]。

从以上三个例子可以看出, 光学 DNA 生物传感器检测时所需时间较短, 传感器重复利用度较高, 但所需仪器大都比较复杂, 在一定程度上限制了它的应用。

2.3 压电晶体 DNA 生物传感器

压电晶体 (piezoelectric crystals) 已经广泛应用于各种化学和生物传感器制作中^[15]。压电晶体在制作完成之后有一个固定频率, 当有少量物质附着在其表面以后, 其共振频率会产生一个变化量, 根据这个原理就可以设计各种传感器。例如 Fawcett 等 (1988 年) 应用压电晶体检测寡核苷酸杂交, 利用晶体振荡频率的变化测定靶核酸量。寡核苷酸固化在压电晶体表面, 然后暴露在单链互补序列中, 一段充裕时间的杂交后检测其共振频率, 孵化前后振荡频率变化说明杂交的程度。

Campbell 等^[10]研制的一种压电晶体传感器是利用晶体表面质量变化原理构建的, 这种传感器是 AT 切割、9 MHz 压电晶体构成。含有核酸探针的叠氮基化合物固化在晶体表面, 也就是用含有 poly A 的叠氮基物质包被晶体, 检测 poly U 杂交, 杂交在液体中完成, 频率的测定在干燥状态下完成。这个系统的优点是可将多个探针固化在晶体上, 可以重复使用, 且不需要标记。与其他检测杂交的方法比较, 这个检测器体积小, 便于携带, 价格便宜, 使用方便。

还有一类压电晶体 DNA 生物传感器是根据压电晶体的声学特性来设计的^[11~13]。厚度剪切模式声波传感器 (thickness-shear mode acoustic wave sensor) 也是一种 9 MHz, AT 切

割的压电晶体, 经处理后将一段寡核苷酸固定在传感器表面, 含有互补序列的杂交液流经传感器表面。在声波衰减长度区域内, 系列共振频率的变化与杂交时 DNA 依赖的粘度变化存在着一定的关系^[13]。根据声学网分析 (network analysis) 就可以推算出被检物的量。Su 等^[12]又将这种技术推广应用到 DNA 连接抗癌药物浓度的测量, 结果表明检测药物浓度可达 10^{-7} mol/L。

3 结 论

以往认为 DNA 生物传感器是一种响应缓慢的传感器, 因为 DNA 杂交的缓慢动力学过程限制了其快速反应能力, 现在看来这个问题已经得到了不同程度的解决。以上几个例子可以看出许多 DNA 生物传感器的检测时间已经缩短至 1 h 之内^[5~7,9,14], 这相对于典型的过夜杂交 (20 h) 来说无疑是一个巨大进步。但是要开发出真正简单实用的 DNA 生物传感器还有一段较长的路要走, 因为目前研制的几种 DNA 生物传感器因技术设备原因还未能得到广泛应用。然而 DNA 生物传感器的开发必将大大改进现有的 DNA 测定方法, 并为快速、自动化检测基因奠定基础, 尤其是在实验研究中。在临床上用于基因疾病快速定性检验, 在食品工业中用于快速检验有无微生物污染的 DNA 传感器的出现是完全有可能的。

参 考 文 献

- Vadgama P, Grump P W. Biosensors: present trends. *Analyst*, 1992, **117**: 1657~1670
- Wolcott M J. Advances in nucleic acid-based detection methods. *Clin Microbiol Rev*, 1992, **5**: 370~386
- Millan K M, Spurmanis A J, Mikkelsen S R. Covalent immobilization of DNA onto glassy carbon paste electrodes. *Electroanalysis*, 1992, **4**: 929~932
- Millan K M, Mikkelsen S R. Sequence selection biosensor for DNA based on electroactive hybridization indicators. *Anal Chem*, 1993, **65**: 2317~2325
- Millan K M, Saraullo A, Mikkelsen S R. Voltammetric DNA biosensor for cystic fibrosis based on a modified carbon paste electrode. *Anal Chem*, 1994, **66**: 2943~2948
- Piunno P A E, Krull U J, Hudson R H E *et al.* Fiber optic biosensor for fluorometric detection of DNA hybridization. *Analytica Chimica Acta*, 1994, **288**: 205~214
- Piunno P A E, Krull U J, Hudson R H E *et al.* Fiber-optic DNA sensor for fluorometric nucleic acid determination. *Anal Chem*, 1995, **67**: 2635~2643
- Vo-Dinh T, Houck K, Stokes D L. Surface-enhanced Raman gene probes. *Anal Chem*, 1994, **66**: 3379~3383
- Watts H J, Yeung D, Parkes H. Real-time detection and quantification of DNA hybridization by an optical biosensor. *Anal Chem*, 1995, **67**: 4283~4289
- Campbell N F, Evans J A, Fawcett N C. Detection of poly U hybridization using azido modified poly A coated piezoelectric crystals. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, **196**: 858~863
- Su H, Yang M, Kallury K M R *et al.* Network analysis: acoustic energy transmission detection of polynucleotide hybridization at the sensor-liquid interface. *Analyst*, 1993, **118**: 309~312
- Su H, Williams P, Thompson M. Platinum anticancer drug binding to DNA detected by thickness-shear-mode acoustic wave sensor. *Anal Chem*, 1995, **67**: 1010~1013
- Su H, Thompson M. Kinetics of interfacial nucleic acid hybridization studied by acoustic network analysis. *Biosensors and Bioelectronics*, 1995, **10**: 329~340
- Nilsson P, Persson B, Uhlen M *et al.* Real-time monitoring of DNA manipulations using biosensor technology. *Anal Chem*, 1995, **224**: 400~408
- Tsacoyeanes J G. Piezoelectric sensors for use as a DNA probe. *Electro-optical materials for switches, coatings, sensor optics, and detectors*, 1990, **1307**: 30~39

Advances in DNA Biosensors. ZHAI Junhui, CUI Hong, YANG Ruifu (*Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071, China*).

Abstract Most recent researches have concentrated on the rapid development of enzymesensors, immunosensors and microbial biosensors, whereas the studies about the DNA biosensor are relatively scarce. The principles of DNA sensor based on the principle of nucleic acid hybridization are reviewed. Several kinds of DNA sensors such as electrochemical, optical, acoustic and piezoelectric are introduced and compared, the high specificity and low responsibility of DNA sensor are also discussed. Generally speaking, DNA biosensor has a more prospective future.

Keywords DNA biosensor, nucleic acid hybridization, probe, piezoelectric, optical fiber