

新技术讲座

DNA 生物传感器在环境污染监测中的应用*

王建龙

(清华大学环境科学与工程系, 环境模拟与污染控制国家重点联合实验室, 北京 100084)

摘要 基于生物催化和免疫原理的生物传感器在环境领域中获得了广泛应用。近年来, 随着分子生物学和生物技术的发展, 人们开发了以核酸探针为识别元件, 基于核酸相互作用原理的 DNA 生物传感器。该传感器可用于受感染微生物的核酸序列分析、优先控制污染物的检测以及污染物与 DNA 之间相互作用的研究, 在环境污染监测中具有潜在的巨大应用前景。简要介绍了核酸杂交生物传感器的基本原理及其在环境微生物和优先控制污染物 (priority pollutant) 检测中的应用研究进展。

关键词 DNA 生物传感器, 核酸杂交, 环境监测, 优先污染物

学科分类号 X835.5

生物传感器在环境监测中起着越来越重要的作用。固定化生物层与目标污染物之间的专一性作用是设计生物传感器的理论基础, 基于生物催化(酶、微生物等)和免疫原理的生物传感器已在环境领域中获得了广泛应用。然而利用核酸探针为敏感元件的传感器在环境监测中开发应用尚处于起步阶段。分子生物学与生物技术的进展为研究 DNA 生物传感器提供了可能。与酶和抗体不同, 核酸识别层十分稳定, 并且易于合成或再生以供重复使用。DNA 环境生物传感器在环境分析领域将起着十分重要的作用^[1]。

DNA 传感器除可用于受感染微生物的核酸序列分析, 微量污染物的监测外, 还可用于研究污染物与 DNA 之间的相互作用, 为解释污染物毒性作用(包括致畸, 致癌, 致突变作用)机理提供了可能。

本文将 DNA 传感器在环境生物技术领域中应用的近期进展作一简要介绍。

1 核酸杂交生物传感器

DNA 序列分析为检测环境微生物和病原菌提供了基础。传统的 DNA 序列分析基于电泳分离与放射性同位素 (³²P) 检测相结合, 该法费时费力, 不适用于日常和快速的环境分析, 尤其是现场检测。新近开发的用于 DNA 序列分析的杂交生物传感器可以大大地减少分析时间, 简化分析手续, 可

用于快速现场监测, 如自来水厂突发性污染事故的分析等。

核酸杂交生物传感器的理论基础是 DNA 碱基配对原理。高度专一性的 DNA 杂交反应与高灵敏度的电化学检测器相结合形成的 DNA 杂交生物传感器, 在环境生物技术领域中将大有可为。在 DNA 杂交生物传感器检测过程中, 形成的杂交体通常置于电化学活性指示剂(如氧化-还原活性阳离子金属络合物)溶液中, 指示剂可强烈地, 但可逆地结合到杂交体上(图 1)。由于指示剂与形成的杂交体结合, 产生的信号可以用电化学法检测^[1]。

Wang 等^[2]开发出了 DNA 杂交生物传感器并用于环境样品的微生物检测, 如水体中病原菌 *Cryptosporidium* 的测定, *Escherichia coli* 的测定。这类传感器的研究包括核酸探针固定化的优化、杂交反应条件、指示剂的结合与检测等。杂交过程并不是一个简单的在液相中探针与 DNA 片段按碱基配对规则形成双链的反应。影响杂交的因素很多, 特别要注意影响杂交反应动力学和效率的因素, 包括杂交时间、离子强度、探针长度、序列和杂交温度等, 以保证其高度专一性和灵敏度。

* 863 基金资助项目 (818-Q-08)。

Tel: (010) 62785684, (010) 62772837,

E-mail: wangjl@tsinghua.edu.cn

收稿日期: 1999-11-30, 修回日期: 2000-03-31

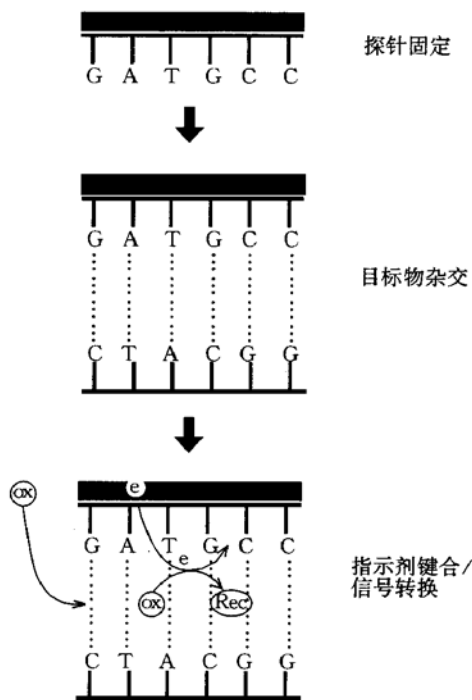


图 1 电化学 DNA 生物传感器杂交检测原理示意图
 Fig. 1 Schematic figure for determination of pollutant by electrochemical DNA biosensor

合适长度的 DNA 片段有利于探针与之杂交, DNA 分子中任何带正电荷或负电荷残基都会影响杂交效率. 此外, 在有利于杂交双链形成的条件下, 探针分子本身也有利于形成自身双链的二级结构甚至三级结构, 使靶序列不易被检测到, 解决杂交中诸多问题的一个重要办法是用 PNA 代替 DNA 作为探针.

Nielson 等^[3]研究了以肽核酸 (peptide nucleic acids, PNA) 作为探针的另一类传感器. 肽核酸是以肽为骨架的一种新型的 DNA 模拟物, 具有与 DNA 和 RNA 结合的高度亲和性, 良好的稳定性, 并能方便地固相合成. PNA 的化学结构如图 2 所示.

其骨架由重复的 N- (2-氨基乙基) -甘氨酸通过酰胺键相连而成^[4]. 在 PNA 中, 中性的准肽链 (pseudopeptide chain) 代替了 DNA 中的戊糖-磷酸骨架 (图 2). 由于没有带电荷的磷酸基团, 杂交时不需要盐离子以抵消 DNA 链之间的静电排斥, 这样 DNA 与 PNA 更易靠近而形成杂交分子, 并且形成的 PNA-DNA 杂交分子的稳定性和碱基配对的特异性得到极大提高. PNA-DNA 形成碱基配对的分子式如图 3 所示^[5].

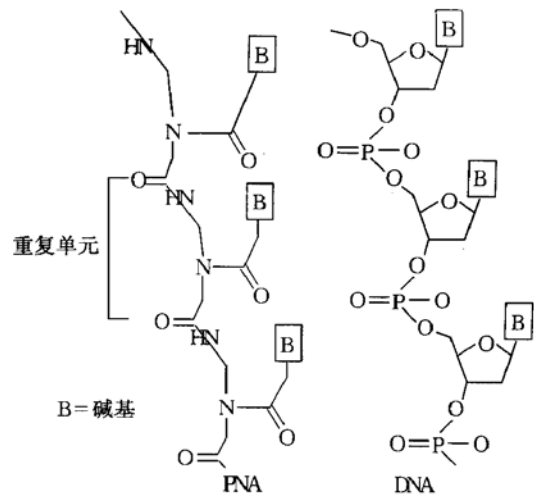


图 2 PNA 与 DNA 结构

Fig. 2 The structure of PNA and DNA

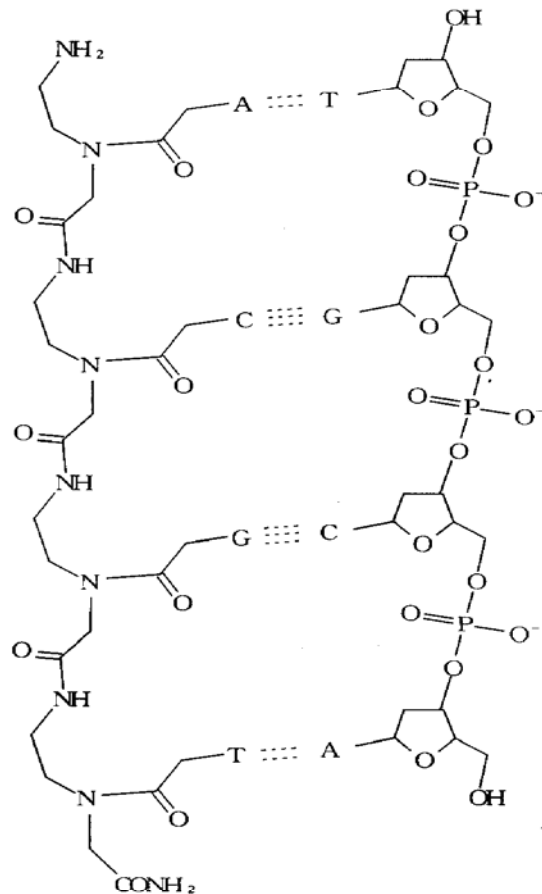


图 3 PNA 与 DNA 的碱基配对

Fig. 3 The base pairing of PNA and DNA

2 污染物的检测

利用 DNA 不同识别模式来设计 DNA 传感器, 除常用的 DNA 碱基配对杂交原理外, 还可利用污

染物的毒性作用(如致癌、致突变)来设计新的环境生物传感器。

Pandey 等^[6]研究了一种 DNA 传感器来检测芳香族化合物。他们用固定化的双链 DNA 分子层作为识别元件,当目标污染物芳香族化合物存在时,溴化乙锭指示剂流动注射响应信号的减弱,可用来测定目标污染物。

Pulecek 等将电极浸泡在修饰溶液中,让生物大分子强烈地,且不可逆地吸附在电极表面,以此来制备核酸修饰滴汞电极,并用于研究 DNA 与药物和蛋白质之间的相互作用。

Wang 等^[7]利用污染物与 DNA 在核酸修饰碳电极表面的相互作用来检测环境中的有毒物质。他们利用双链 DNA (ds DNA) 层与芳香胺之间的键合作用,设计了一种新型的亲和电化学生物传感器,并用于检测芳香胺类化合物,检测限达到纳摩尔量级。图 4 显示了利用该传感器分析受污染地下水样品的结果。经过非常短的预浓缩时间(3 min)后,当加入 4×10^{-7} mol/L 和 8×10^{-7} mol/L 2-氨基蒽时,传感器检测出两个氧化峰值。(图 4b、c 中的 II)。未受 2-氨基蒽污染的天然地下水不产生检测信号峰。峰 I 大约在 +1.0 V 处,为 DNA 鸟嘌呤残基的氧化峰。可以看出,随着芳香胺浓度升高,阴极鸟嘌呤峰逐渐变弱。这是由于芳香胺与 ds DNA 键合导致鸟嘌呤部分变化引起的。

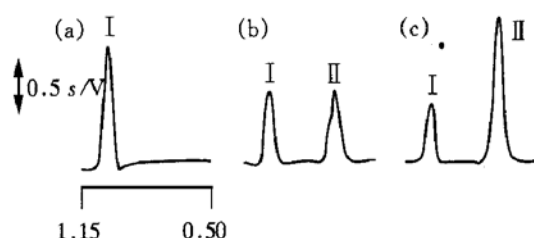


图 4 DNA 碳电极生物传感器测定受污染地下水中的 2-氨基蒽

(a) 未受 2-氨基蒽污染的地下水; (b) 加入 4×10^{-7} mol/L 2-氨基蒽; (c) 加入 8×10^{-7} mol/L 2-氨基蒽。

Fig. 4 Determination of 2-aminanthracene in the contaminated groundwater by carbon electrode of DNA biosensor

他们还开发了一种高灵敏度的 DNA 生物传感器用于检测胍类化合物。将 ds DNA 修饰电极置于该类化合物中,由于 N-甲基鸟嘌呤形成,引起鸟嘌呤峰减弱(因为鸟嘌呤的氧化是通过 N⁷ 位置进行的)。这种鸟嘌呤响应峰的抑制与胍类物质的浓度相关性很好,从而为检测环境中微量胍类物质污

染提供了一种方便快捷的方法。

DNA 内在响应的变化还可用于检测 DNA 的物理损伤。近年来,开发分析评价 DNA 辐射损伤的方法越来越引起注意, Palecek 等早期研究工作是利用滴汞电极的极化曲线来分析 γ -辐射和紫外辐射对 DNA 的损伤。该法依赖于辐射剂引起的 DNA 双螺旋结构的构型和结构的微小改变与 DNA 电化学生物响应的灵敏度。

Wang 等^[1]目前正在致力于利用阴极 DNA-鸟嘌呤的信号改变来开发微结构传感器芯片,用于检测辐射损伤。该传感器还可用于筛选会引起 DNA 损伤的化学试剂。

DNA 生物传感器除用于检测外,还可用于研究污染物与 DNA 之间相互作用,用于解释不同污染物的毒性作用机理。例如, DNA 传感器可用于适时研究 DNA 与化学诱变剂之间反应动力学。在污染物与 DNA 结合相对强度方面提供有用信息,解释污染物-DNA 键合的专一性,或探讨 DNA 结构变化。

3 结 语

DNA 生物传感器应用于环境污染监测有着广阔的前景。目前,核酸识别分子层的研究与利用还处于初期阶段。DNA 生物传感器为生物传感器家族中添加了新的成员, DNA 传感器的实现需要正确地选择核酸探针及其固定化和 DNA 识别信号的有效转换与检测。毫无疑问,随着该项技术的不断深入研究和日臻成熟, DNA 生物传感器将成为环境污染监测领域中的一个重要手段。

参 考 文 献

- 1 Wang J, Rivas G, Cai X, *et al.* DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring. A review. *Anal Chim Acta*, 1997, **347** (1): 1~ 8
- 2 Wang J, Chicharro M, Rivas G, *et al.* DNA biosensor for the detection of hydrazines. *Anal Chem*, 1996, **68** (13): 2251~ 2254
- 3 Nielson P, Egholm M, Berg R, *et al.* Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science*, 1991, **254** (8): 1497~ 1500
- 4 万 群, 魏东芝, 袁勤生, 等. DNA 芯片技术. 生命的化学, 1999, **19** (2): 83~ 88
Wan Q, Wei D Z, Yuan Q S, *et al.* *Life Chem*, 1999, **19** (2): 83~ 88
- 5 何冬梅. 核肽酸——一种新型的反义物质. 生命科学, 1999, **11** (3): 107~ 110

- He D M. Life Chem, 1999, **11** (3): 107~ 110
- 6 Pandey P, Weetall H. Detection of aromatic compounds based on DNA intercalation using an evanescent wave biosensor. Anal Chem, 1995, **67** (4): 787~ 792
- 7 Wang J, Cai X, Johnson C, *et al.* Trace measurements of RNA by potentiometric stripping analysis at carbon paste electrodes. Anal Chem, 1995, **67** (22): 4065~ 4070

The Application of DNA Biosensors for the Environmental Monitoring

WANG Jian-Long

(State Key Joint Laboratory of Environment Simulation and Pollution Control, Department of Environmental Science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China).

Abstract The biosensors based on biocatalytic and immunosensors have gained increasing applications in environmental biomonitoring. Along with the advances in molecular biology and biotechnology, the DNA biosensors, based on DNA interaction and using nucleic acid as recognition element, was developed. They can be used for the hybridization detection of nucleic acid sequences from infectious microorganisms, for monitoring of priority pollutants and for the interacting study of pollutants and DNA. They possess a great potential for environmental monitoring. The principle of nucleic acid hybridization biosensors and their applications for the detection of environmental microorganisms and the priority pollutants was briefly described.

Key words DNA biosensor, nucleic acid hybridization, environmental monitoring, priority pollutant

* This project is supported by 863 foundation. The project is "Rapid determination of BOD by biosensor".

Tel: 86-10-62785684, 86-10-62772837, E-mail: wangjl@tsinghua.edu.cn

Received: November 30, 1999 Accepted: March 31, 2000

大连民族学院招聘启示

大连民族学院是一所隶属于国家民族事务委员会的高等院校，位于景色秀美的大连经济技术开发区，依山傍海，地理位置优越。大连民族学院生物工程学科是学院重点建设学科，现已具备了较好的教学和科研条件，为本学科及专业的未来发展和培养高素质人才的需要，欲招聘下列人员，从事教学和科研工作。条件为45岁以下，具有博士学位的高级科学人才，一经录用各方面待遇从优，热忱欢迎有识之士与我们联系。

所需专业(方向)为：有机化学，生物化学，生物化学工程及生物工程相关的专业，新材料科学

联系人：范圣第

电话：0411-7619142

E-mail: fsd@dlnu.edu.cn