

Biology, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China; ¹⁾ The 155th Hospital of PLA, Kaifeng 475003, China).

Abstract The cyclopentenone prostaglandin A2 (PGA2) exhibits potent antiproliferative and antitumor activities both *in vitro* and *in vivo*, leading to cell cycle arrest associated with a dramatic decrease in the levels of cyclins and cyclin-dependent kinases (CDKs), and accompanied by an obvious increase of the expression of one of

the cdk inhibitors, p21waf1/cip1. p21 waf1/cip1 protein (p21) can also mediate p53 dependent or p53-independent G1 arrest of many cell types, and plays an important role in PGA2-induced cell cycle arrest. Latest progress on the role of interaction of p21 and transcription factor E2F played in PGA2-mediated cell cycle arrest is reviewed.

Key words prostaglandin A2, G1 arrest, p21waf1/cip1, E2F, pRb

核酸生物传感器及其研究进展

朱 滨 王国荃

(新疆医学院预防医学系, 乌鲁木齐 830054)

摘要 核酸生物传感器在涉及分子生物学的研究领域具有重要意义. 为适应分子生物学及其相关学科的发展需要, 其研究正成为 90 年代生物传感技术研究热点. 文章对核酸生物传感器的工作原理、分类、研究现状以及发展趋势作了较详细的介绍.

关键词 核酸, 传感器, 生物传感器

1 核酸生物传感器

核酸生物传感器 (nucleic acid biosensor, NABS) 是指以核酸物质为检测对象, 在待测物的识别及信号转化中涉及了生物、生化过程的一类传感器, 是生物传感器的一个分支. 通常认为, 其包含两部分^[1]: 识别器件 (sensing element) 和转换器件 (transducer). 但是要从结构上或组成上区分二者常常是困难的. 许多时候, 同一种 (或一组) 物质同时具有二者的属性. 虽然如此, 在阐述生物传感器工作原理的时候, 这种区分是十分必要的. 识别器件主要用来感知样品中是否含有 (或含有多少) 待测物质; 转换器件则将识别器件感知的信号转化为我们可以观察记录的信号 (如电压、电流大小; 荧光、光吸收的强度等). 在待测物、识别器件以及转化器件之间由一些化学、生物、生化作用或物理作用过程彼此联系 (图 1).

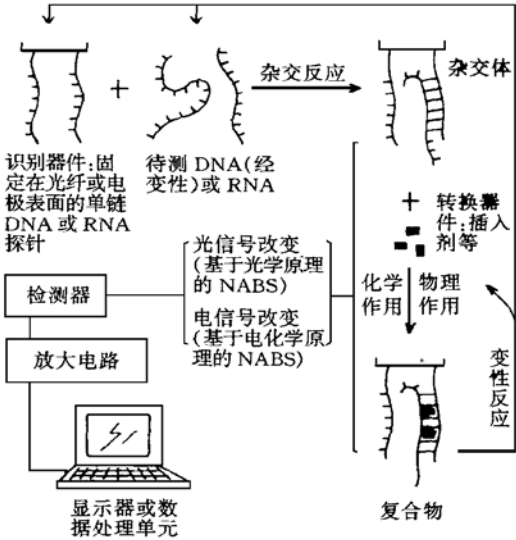


图 1 核酸生物传感器工作原理示意图

按 NABS 转换器件转换信号的不同可将其分为电化学原理和光学原理两大类。根据结构或者传输信号的不同, 又将第一大类分为修饰电极^[2]、离子敏感场效应晶体管^[3]、压电晶体^[4]等类型; 将第二大类分为基于荧光原理^[5]、基于表面等离子体共振 (surface plasmon resonance, SPR) 原理^[6]、基于化学 (生物) 发光原理^[7]、基于损耗波 (evanescent wave) 原理^[8]等类型。另一种分类方法是根据检测对象的不同而将 NABS 分为 DNA 生物传感器 (包括核内 DNA、核外 DNA、cDNA、外源 DNA 等) 和 RNA 生物传感器 (包括 mRNA、tRNA、rRNA、外源 RNA 等) 两大类。第一种分类方法利于读者根据自己的兴趣、经验以及实验室条件等作出合适的选择; 第二种分类方法利于读者对传感器的检测对象及应用范围的了解。目前在文献中两类分类方法是混用的。

2 研究进展

不同的识别器件与转换器件的组合为 NABS 的研究开发提供了广阔天地。对 NABS 的识别器件的要求是能迅速地、特异地、灵敏地、可逆地指示出样品中是否存在或存在多少特定序列的 DNA 或 RNA 片段 (即目的片段)。众所周知, 核酸的杂交反应具有高度的特异性和灵敏性, 而且通过温度调节可以很容易地使反应正向或逆向进行。因而目前报道的绝大部分不同类型的 NABS 都不约而同地将核酸的杂交反应作为其识别器件的工作原理。但不同类型的 NABS 的转换器件组成却很不相同。以 Hashimoto 等^[9]报道的 NABS 为例, 他们首先合成一段与目的基因 (癌基因 V-myc) 互补的寡核苷酸 (5'-TGCAGTTCGGTGGCTGATC-3') 探针, 利用化学吸附原理将探针固定到平底热解石墨电极 (basal plane pyrolytic graphic BPPG) 表面。电极表面的探针在约 40℃可与 V-myc 基因进行杂交反应而形成双链, 由此可识别样品中是否存在 V-myc 基因。为了测定识别器件 (探针) 识别到的信

号, 杂交反应完后, 将电极置于含吖啶橙的溶液中, 作为传感器转换器件有机组成部分的吖啶橙分子 (虽然它不是修饰电极的固有组成部分, 但却是测定中不可或缺的部分) 插入到电极表面形成的 DNA 双链分子的碱基对之间而引起伏安测定中峰的正向漂移增加, 且增加幅度正比于 V-myc 基因的浓度。作为光学 NABS, Graham 等^[8]报道的检测损耗波信号的传感器虽然也是将短的 (16~ 20 mer) 寡核苷酸键合到光波导表面作为识别器件, 但其转换器件却是待测 DNA 片段上的荧光标记物。一次测定完成后, 将传感器表面加热, 使其表面因杂交而结合的样品中特定 DNA 片段变性解离下来, 传感器就可用于下一个样品的测定, 这样可使传感器反复使用许多次。

目前在 NABS 的研究中, 虽然较好地解决了可逆性和特异性识别的问题, 但在传感器的响应时间和灵敏度方面却不尽人意。在已报道的各种 NABS 中, 响应时间大部分在几十分钟到 1 小时以上^[8~ 10], 这与目前应用的常规杂交分析如 DNA 杂交、RNA 杂交相比并不算长, 但对于传感器来说是太长了。这不仅使其动态监测的优势大打折扣, 而且对于大批量样品测定, 这将成为其致命弱点。在灵敏度方面, NABS 目前还远达不到常规非放射杂交方法具有的灵敏度 (10^{-18} mol/L)^[11]。就核酸杂交反应而言, 杂交时间 (响应时间) 与杂交量 (灵敏度) 是一对矛盾因素。在其他条件一定的情况下, 要保证良好的灵敏度, 缩短杂交时间常常是困难的。如何在不损失或保证足够灵敏度的前提下缩短杂交时间成为 NABS 研究者们关注的问题。

从目前的研究报道来看, 主要存在两种趋势。一是利用 PCR 等扩增技术来弥补 NABS 灵敏度低的不足。Strachan 等^[12]描述了用光纤生物传感器鉴定 PCR 产物的实验。首先用 PCR 扩增 *Listeria* 的 *flaA* 基因的 200 mer 片段, 扩增所用引物以生物素和荧光标记。扩增产物可与传感器表面固定的互补序列杂交, 并因而在传感器表面产生一可检测到的荧光信

号, 该信号强度与扩增产物的量成正比, 也与其他条件有关. Tsuruta 等^[3]也报告了以 H^+ 敏感场效应晶体管 (pH-ISFET) 为核心的基于 ELISA 反应原理的检测 PCR 产物的生物传感系统. 这种技术联合的思路是值得借鉴的, 但 PCR 技术本身在定量分析方面能力有限, 而且在操作及分析时间方面都不具有太大优势, 因而在实际应用中让人们放弃电泳技术而用 NABS 来检测 PCR 产物是困难的. 如能将分子生物学中批量分析技术与传感器的光学 (或电学) 自动检测技术结合起来似更有前途^[13]. 另一种趋势是在传感技术本身上挖潜力, 采用新技术、新方法提高灵敏度, 缩短响应时间. 其中值得提及的技术有两种: 一是表面等离子体共振 (SPR) 技术; 另一是荧光检测技术.

SPR 技术通常是在几十纳米厚的金属 (金、银等) 表面固定一对可发生特异结合的物质对 (如抗原-抗体、半抗原-抗体、DNA-DNA 等) 中的一个, 当待测液中存在其配体 (待测物) 时, 二者就结合成物质对, 这将导致金属表面对入射单色光的反射率发生改变, 进而引起单色光在液面与波导界面上折射率的改变. 用光波导将折射率的变化传输给检测器而达到检测待测物的目的. 由于该技术的高灵敏性, 以及在杂交识别过程中引入了加速剂^[14], 使该技术在 DNA 检测的灵敏度和响应时间上均有了很大改进. 加上该技术不需对探针或样品进行事先标记, 成本低、简单. 因而被许多传感器研究者采用. Pollard 等^[6]和 Nilsson 等^[15]都分别报道了基于该原理的 NABS, 检出灵敏度达 10 fmol/mm^2 , 响应时间 $< 5 \text{ min}$. Wood^[14]更是对该技术在 DNA 杂交检测的准确度、精密度、使用条件等作了详细探讨. Kruchinin 等^[16]在其研制的基于 SPR 原理的 NABS 中, 将折射率的测定改为测定反射光中 P 和 S 偏振光组分的比率, 使灵敏度提高了二个数量级.

荧光检测技术虽不是什么新技术, 但激光荧光分析、时间分辨荧光分析以及共振能量转

移荧光分析等技术在生物传感器的研究中却大有用武之地^[1]. Syvanen 等^[17]利用时间分辨荧光分析技术检测了腺病毒 DNA, 检测限达 0.3 pg . Okano 等^[18]利用 Ar 激光器为光源测定荧光标记 DNA, 检出限达到 10^{-19} mol/L 的水平. 在基于荧光原理的 NABS 的设计上, Paul 等^[5]的工作具有一定启发性: 该传感器是用荧光显微镜改造而成的, 结构参阅原文. 取小段石英光纤, 表面经衍生化处理, 然后利用氨基磷酸酯固相合成法在其上合成单层单链 DNA 膜. 将该小段光纤固定在 3 ml 塑料小桶中, 小桶中充满杂交缓冲液, 测定时向小桶中注入含溴乙锭 (EB) 的单链 DNA 样品, 在适宜的杂交温度下, 固定在光纤表面的单链 DNA 将与溶液中互补的 DNA 或 RNA 杂交, EB 分子将嵌入杂交体双链的碱基对之间, 这将使 EB 的荧光信号增强 100 倍以上. 通过测定荧光信号的变化, 可知溶液中含多少目的 DNA. 如果能将 EB 分子用长臂连接到传感器表面, 可能更理想一些. 该传感器至少能反复使用五次以上, 保存 1 年而响应活性不变.

在 NABS 的发展中, 传感器的贮存与使用寿命问题不应忽视. 核酸探针在传感器表面的固定技术是影响传感器使用寿命的一个重要因素. 目前报道的核酸固定技术包括: 共价结合^[2, 10, 19]、化学吸附^[9, 20]、亲合固定^[15]等. 从耐用性考虑, 以共价结合为优, 但程序复杂、成本高是其不足. 在 NABS 的应用方面, 许多学者都作了或详或简的论述^[1, 2, 7, 15, 20]. 一般认为在涉及核酸检测的临床诊断、分子克隆以及食品、环境分析中, 在核酸杂交动力学、酶反应动力学、DNA 合成以及 DNA 突变分析 (包括点突变) 等科研工作中, NABS 都可望占有一席之地. 但也要看到, 目前 NABS 研究还处于初级阶段, 虽然在某些方面有所突破, 但其整体实力尚不足以与现行的 PCR、放射性或非放射性杂交分析方法竞争, NABS 的商业化进程还任重而道远. 试剂和仪器生产开发机构在这方面的投入将会加快这一进程.

参 考 文 献

1 Downs M E, Kobayashi S, Karube I. New DNA technology and the DNA biosensor. *Anal Lett.* 1987, **20** (12): 1897~1927

2 Millan K M, Mikkelsen S R. Sequence-selective biosensor for DNA based on electroactive hybridization indicators. *Anal Chem.* 1993, **65** (17): 2317~2323

3 Tsuruta H, Matsui S, Hatanaka T *et al.* Detection of the products of polymerase chain reaction by an ELISA system based on an ion sensitive field effect transistor. *J Immunol Methods.* 1994, **176** (1): 45~52

4 Fawcett N C, Evans J A, Chien L Y *et al.* Nucleic acid hybridization detected by piezoelectric resonance. *Anal Lett.* 1988, **21** (7): 1099~1114

5 Paul A E P, Ulrich J K, Robert H E H *et al.* Fiber-optic DNA sensor for fluorometric nucleic acid determination. *Anal Chem.* 1995, **67** (15): 2635~2643

6 Pollard K D, Hawkins E, Yeung D *et al.* Immunoassays and nucleic acid detection with a biosensor based on surface plasmon resonance. *Ann Biol Clin Paris.* 1990, **48** (9): 642~646

7 Downs M E, Warner P J, Turner A P *et al.* Optical and electrochemical detection of DNA. *Biomaterials.* 1988, **9** (1): 66~70

8 Graham C R, Leslie D, Squirrel D J. Gene probe assays on a fibre-optic evanescent wave biosensor. *Biosens Bioelectron.* 1992, **7** (7): 487~493

9 Hashimoto K, Miwa K, Goto M *et al.* DNA sensor: a novel electrochemical gene detection method using carbon electrode immobilized DNA probes. *Supramol Chem.* 1993, **2**: 265~270

10 Hashimoto K, Ito K, Ishimoyi Y. Novel DNA sensor for electrochemical gene detection. *Anal Chim Acta.* 1994, **286**: 219~224

11 王申五主编. 基因诊断技术——非放射性操作手册. 北京: 北京医科大学/中国协和医科大学联合出版社, 1993: 19~20

12 Strachan N J, Gray D I. A rapid general method for the identification of PCR products using a fiber-optic biosensor and its application to the detection of *Listeria*. *Lett Appl Microbiol.* 1995, **21** (1): 5~9

13 朱 滨, 王国荃. 基因诊断技术进展. *中华医学检验杂志*, 1996, **19** (5): 298~300

14 Wood S J. DNA-DNA hybridization in real time using BIA-core. *Microchem J.* 1993, **47**: 330~333

15 Nilsson P, Persson B, Uhlen M *et al.* Real time monitoring of DNA manipulations using biosensor technology. *Anal Biochem.* 1995, **224** (1): 400~408

16 Kruchinin A A, Vlasov Yu G. Surface plasmon resonance monitoring by means of polarization state measurement in reflected light as the basis of a DNA-probe biosensor. *Sensors and Actuators B.* 1996, **30** (1): 77~80

17 Syvanen A C, Tchen P, Ranki M *et al.* Time resolved fluorometry: a sensitive method to quantify DNA-hybrids. *Nuc Acids Res.* 1986, **14** (2): 1017~1028

18 Okano K, Kambara H. DNA probe assay based on exonuclease III digestion of probes hybridized on target DNA. *Anal Biochem.* 1995, **228** (1): 101~108

19 Karymov M A, Kruchinin A A, Tarantov Yu A *et al.* Fixation of DNA directly on optical waveguide surface for molecular probe biosensor development. *Sensors and Actuators B.* 1995, **29** (1, 2, 3): 324~327

20 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** (18): 2943~2948

Current Status and Prospects for the Nucleic Acid Biosensors. ZHU Bin, WANG Guoquan (*Department of Public Health, Xinjiang Medical College, Urumqi 830054, China*).

Abstract Study of the nucleic acid biosensors have important significance in the fields related to molecular biology. In order to meet the needs for practice, the study of the nucleic acid biosensors was stressed in the sensor field recently. The principles, classification, current status and prospects of the nucleic acid biosensors were described.

Key words nucleic acid, sensor, biosensor

Fenton 反应及其可能的活性产物*

王玉秋 何锡文

(南开大学化学系, 天津 300071)

摘要 活性氧对许多生物分子, 如脂质、蛋白质和DNA等均可引起损伤, 它与许多疾病过程相联系。

* 国家自然科学基金资助课题 (29575200). 收稿日期: 1996-10-22, 修回日期: 1997-05-07