中国科学 (C 辑)
第27卷 第4期 SCIENCE IN CHINA (Series C) 1997年8月

基于引物链延伸反应的基因传感器的研究*

陈誉华 宋今丹
(中国医科大学细胞生物学卫生部重点实验室,沈阳 110001)

李大为
(沈阳东宇电子研究所,沈阳 110003)

摘要 依据晶体谐振频率是其表面沉积物的函数和模板-引物杂交后引物链延伸的酶促反应原理,构建了引物链延伸反应性基因传感器技术. 该技术的主要特点是以快速、敏感的频变信息作为基因杂交与引物链延伸的显示系统. 研究结果提示,本项技术可用于核酸同源性分析、微量DNA检测、DNA整合性的确定,也可用于目的基因的分离、特定条件下的基因突变分析及推断某基因在其基因组中的位置.

关键词 核酸杂交 引物链延伸反应 生物传感器 压电晶体

核酸杂交技术是进行分子生物学研究的重要方法之一. 因之,围绕该技术的新方法的研究一直是人们感兴趣的问题. 近年来,人们在不断地改进和建立新的杂交类型与检测方法过程中已开始注意到开发核酸或基因传感器. 基因传感器是在换能器上固化有单链特异基因或核酸片段的生物传感器,能与同源DNA杂交,并把杂交前后的光电变化或频率变化经电子放大后直接显示出来,从而对DNA进行定性和定量分析[1-3]. 从迄今已报道的文献看,虽然基因传感器的研究结果有希望开发出供杂交分析用的自动化仪器产品,但要取代传统的以放射性同位素或非放射性物质标记核酸的杂交法是非常困难的,因为除多种影响因素外,基因传感器的低敏感性是阻碍它应用的最主要因素. 因此,本文从提高基因传感器的敏感性角度出发,利用压电晶体的特性和DNA序列分析中应用的模板-引物杂交后引物链延伸的反应原理,以单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV)和人细胞内质网分子伴侣Grp(glucose regulated protein)94基因组为例,首次尝试了引物链延伸反应性基因传感器的研制.

1 设计原理

将生物特异的单链DNA或基因片段与压电晶体镀膜电极交联固定、制成基因传感器. 固化在压电晶体上的单链DNA或基因在适当条件下(杂交反应体系中)可依碱基互补原则与其同源DNA形成双链. 如果双链中的两单链不等长,则短链可作为引物,在适宜条件下以长链为模板得以逐步延伸,理论上,延伸反应的最后结果是复制出1条与参与杂交的核酸的长链等长的1条链(图1). 上述变化势必导致晶体质量的增加,而晶体质量的增加又必然会引起晶体振动频率的下降,且晶体质量 M 的增量与振动频率的变化 $\triangle F$ 呈负相关(简化的Sauerbrey方程 $\triangle F = -K\triangle M$, K 为常数)[4]. 该频率变化可由DNA或基因检测系统(图2)读出.

1996-05-04收稿,1996-08-22收修改稿
* 国家自然科学基金资助项目

基因检测系统的设计原则为，用 IC74HCT04 和 74HCT00 构成差动振荡电路，晶振 XTAL1 为参比传感器，XTAL2 为基因传感器，2 组频率信号经与非门相差得到频率差值$\triangle f$，由数字频率计检测、经 GP-IB 总线接口进入微机进行处理(图 2).

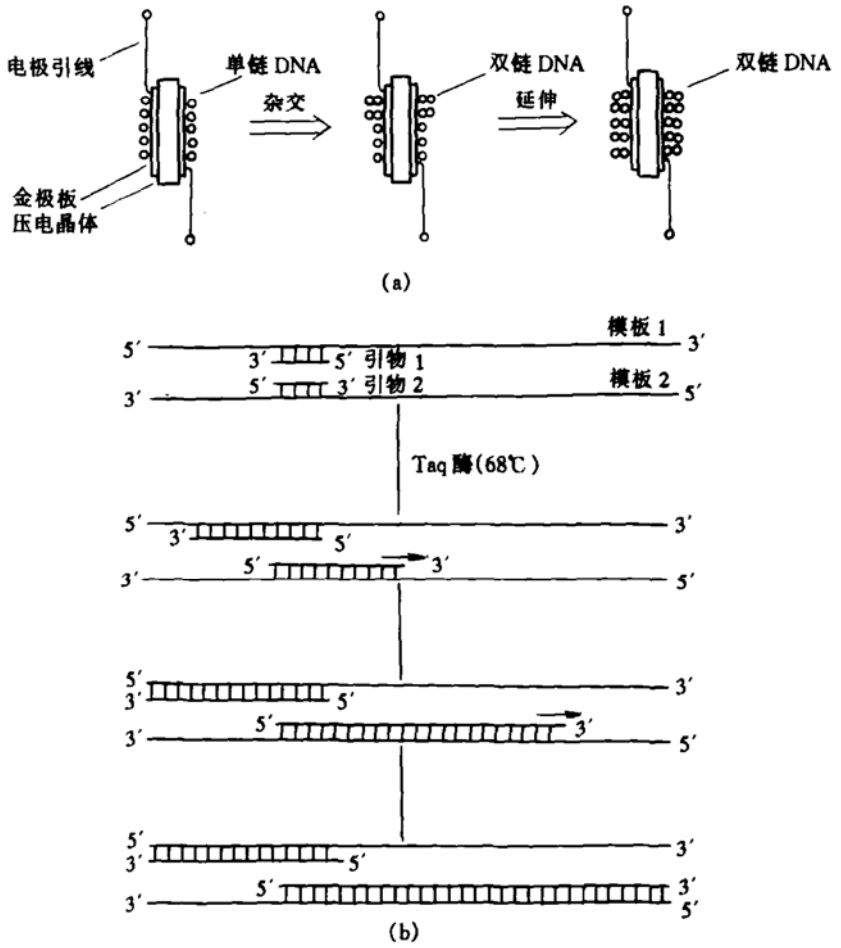

图 1　引物链延伸反应性基因传感器原理模式图

(a)模式图，(b)延伸反应图．模板 1，2 为参与杂交的核酸的长链，引物 1，2 为杂交短链

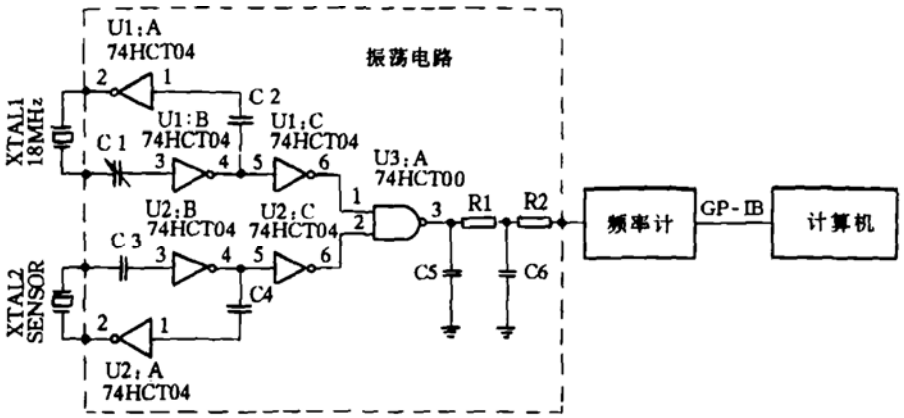

图 2　基因检测系统构成

2 实验材料与制备方法

2.1 材料与试剂

HSV-1(SM44), HSV-2(333)标准株引自中国预防医学科学院病毒学研究所. 人结肠癌细胞系 CCL229 细胞与人早幼粒细胞白血病细胞系 HL-60 细胞, 由美国哈佛大学 Dana-Farber 肿瘤研究所惠赠. γ-APTES(3-aminopropvltriethoxy-silane)、BSA、蛋白酶 K、RNase、ΦX174/HaeⅢ, 美国 Sigma 公司产品. 大肠杆菌 DNA 聚合酶Ⅰ Klenow 大片段、Taq 酶、AMV 反转录酶、dNTP, promega 公司产品. 琼脂糖、溴化乙锭、Ficoll400、SDS、Tris 及聚乙烯吡咯烷酮, 购自上海化学试剂采购供应站(进口分装).

3000Xi 型电源, 美国 Bio-Rad 公司产品. 频率计为中国台湾 Good Will Instriment Coltd (GW)公司产品. 屏蔽箱、数据采样卡、压电晶体(AT 切型、镀金、基础频率为 10 MHz)、振荡电路模块, 市售.

2.2 杂交用全基因组及部分基因片段 DNA 的制备

全基因组 DNA 的制备: HSV-1, HSV-2 接种于原代兔肾单层细胞培养, 至 CPE(cytopathogenic effect)达 75% ~ 100% 时, 收集病变细胞, 按我们修改后的 Mocarski 法[5]提取 HSV-1, HSV-2 DNA. CCL229 与 HL-60 细胞 DNA 的提取按常规方法进行.

用 PCR/RT-PCR 扩增 HSV 和内质网分子伴侣 Grp94 部分基因片段: HSV-1, HSV-2 DNA PCR 引物按板岡 博等人[6]的研究结果, 设计引物 P_1: 5′ TGACGTTTGCCTGGTTCCTGG3′和 P_2: 5′AGCCGCCGACCGCCTGCT3′, 使扩增的 DNA 片段位于 HSV DNA 指纹图谱上 0.64 单位附近, 即"UL44 和 UL45 基因的部分序列 + UL44 与 UL45 之间的非编码序列". CCL229 与 HL-60 细胞 RNA 的提取按我们建立的方法[7]进行. 内质网分子伴侣 Grp94 RT-PCR 的引物, 参照 Maki 等人[8]发表的人白细胞 Grp94 cDNA 序列, 于 cDNA 近 3′端设计引物: P_1: 5′ CAGTTTTGGATCTTGCTGTGG3′ 和 P_2: 5′ CAGCTGTAGATTCCTTTGC3′. 按常规步骤与循环参数扩增. 扩增产物经 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定.

2.3 压电晶体表面的修饰与单链 DNA 在压电晶体表面的固定化

以表面覆有金膜(0.3 cm^2)的压电晶体为阳极, Ag/AgCl 电极为阴极, 在 0.5 mol/L 的 NaOH 溶液中, 保持恒定电压 1.5V, 20 min 以氧化金膜. 氧化后取出压电晶体, 置 2% γ-APTES 液中 1 h, 之后, 置室温干燥 2 h. 接着, 将压电晶体放入微型架桥电泳槽中, 在电泳液(Tris 硼酸缓冲液)中加入变性的单链 HSV-1、HSV-2、人细胞 DNA 及在前述引物作用下扩增出的 HSV-1, HSV-2 的 PCR 产物和 Grp94 RT-PCR 产物(经变性处理, 均为 2 μg), 压电晶体作阳极, 铂丝作阴极, 在恒定电流 5mA 条件下, 电泳 20 min 使单链 DNA 富集在压电晶体表面, 借紫外光照射将 DNA 交联固定在晶体上.

2.4 DNA 杂交和引物链延伸反应

将经上述处理的压电晶体, 放入含有与固定在压电晶体表面上 DNA 互补的单链 DNA 杂交液(1 mL 常规用杂交液, 1 μg 目的 DNA)中反应 3 h(43℃), 取出晶体, 依次用 2 × SSC, 0.1% SDS; 0.2 × SSC, 0.1% SDS; 0.1 × SSC, 0.1% SDS 及去离子水各洗 2 次, 每次 2 min(室温下), 干燥后进行引物链延伸反应. 其系统是将杂交后经无菌去离子水洗清的晶体置入 100

μL 反应液中，反应液含 10×PCR buffer、50% 甘油、dNTP(2mmol/L)各 10 μL，Taq 酶 1.5 μL，ddH_2O 68.5 μL 以石蜡油封闭后，68℃反应 3 h，取出晶体以灭菌去离子水洗 3 次，室温干燥.

2.5 测试及测试条件

在测试前，调整参比传感器的振荡电路中的电容 C1，使输出 $\Delta f=0$. 分别将上述固化有单链 DNA 的压电晶体及经进一步杂交、引物链延伸反应后的该晶体作为基因传感器，干燥后进行测量. 测量反应在恒温(25℃)的屏蔽箱内进行，以基因传感器插入基因测量系统后，频率计上的读数稳定时的数据为测量数据.

2.6 引物链延伸反应性基因传感器的敏感性

取固化有单链 HSV-1 全基因组 DNA 的压电晶体，分别放入含 50，10 和 1pg 变性后 HSV-1 PCR 产物的杂交液(1 mL)中，杂交后按引物链延伸反应处理，然后测量. 杂交前后及引物链延伸反应后的频率值分别记作 F_1，F_2，F_3.

3 测试结果

3.1 PCR/RT-PCR 结果

测试结果见图 3，4.

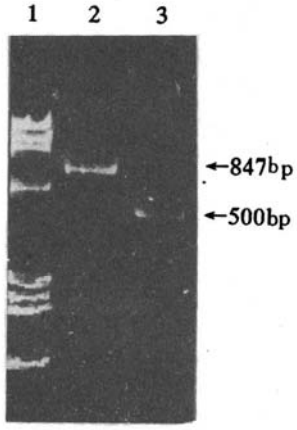

图 3　HSV DNA PCR 产物的 PAGE

1 为 ΦX174/HacⅢ，自上而下依次为 1353，1078，872，603，310，281，271，234，194，118，72bp；2 为 HSV-1 (SM44)；3 为 HSV-2(333)

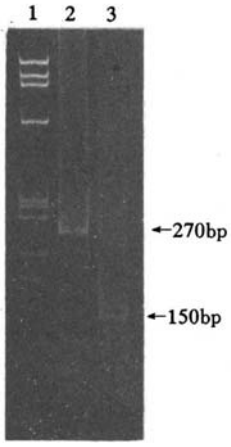

图 4　Grp94 的 RT-PCR 产物的 PAGE

1 为 ΦX174/HacⅢ，自上而下依次是 1353，1078，872，603，310，281，271，234，194，118，72bp；2 为 HL-60 细胞；3 为 CCL229 细胞

3.2 引物链延伸反应性基因传感器的测试结果

图 5(a)所示，引物链延伸后，质量明显增加(频率明显降低)；各受检样品 DNA 在延伸反应过程中呈现良好的重现性(图 5(b)中延伸反应后无频率降低)，反映出本文建立的引物链延伸反应性基因传感器具有高度的特异性. 全基因组和部分基因片段作探针在检测上无明显差异(图 5(a)).

3.3 引物链延伸反应性基因传感器的敏感性

经延伸反应后，基因探针传感器敏感性可达 10pg(表 1).

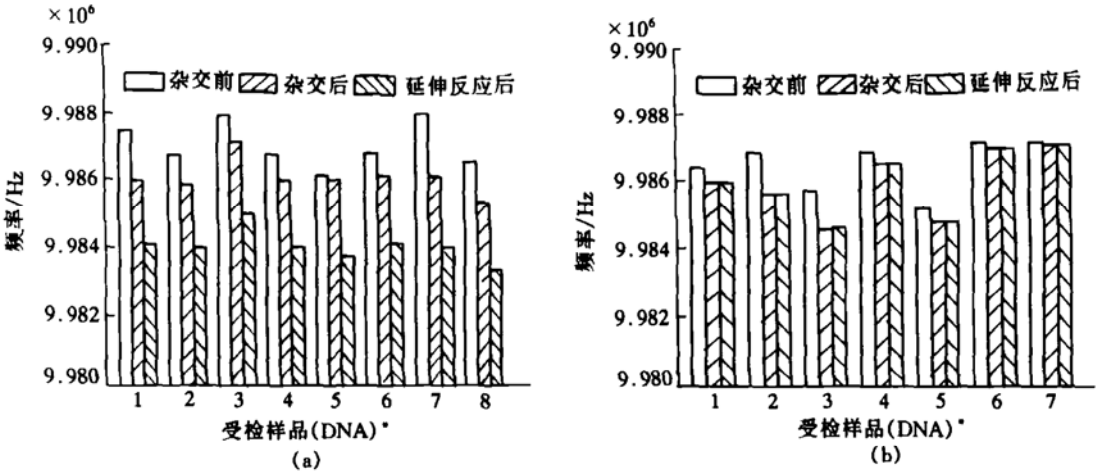

图5 引物链延伸反应性基因传感器测试结果

(a) * 若受检样品为全基因组,则对应的探针为其 PCR/RT-PCR 产物;若受检样品为 PCR/RT-PCR 产物,则对应的探针为全基因组.1~8 依次为 HSV-1、HSV-1 PCR 产物、HSV-2、HSV-2 PCR 产物、人细胞△、人细胞△△、HL-60 RT-PCR 产物、CCL229RT-PCR 产物. △为探针 HL-60RT-PCR 产物;△△为探针为 CCL229RT-CR 产物;(b) * 受检样品与基因组探针系同一种大小 DNA. 1~7 依次为 HSV-1、HSV-2、人细胞、HSV-1 PCR 产物、HSV-2 PCR 产物、HL-60 细胞 RT-PCR 产物、CCL229 RT-PCR 产物

表1 引物链延伸反应性基因探传感器的敏感性(频率×10^6Hz)

受检样品 HSV-1 DNA PCR 产物/pg	F_1(杂交前)	F_2(杂交后)	F_3(延伸反应后)
50	9.981 95	9.981 96	9.981 74
10	9.987 26	9.987 28	9.987 23
1	9.983 41	9.983 44	9.983 46

4 讨论

据引物链延伸反应性基因传感器的原理可知:其主要的适用条件是杂交的2条链必须是不等长的,且相差愈大愈好;其次,引物链(杂交的短链)的3′端碱基必须与模板(杂交的长链)完全配对. 因为我们的研究结果显示,无论是用长链还是短链,经引物链延伸反应后,其谐振频率的改变 ΔF 无明显差别(图5(a)). 研究结果表明,本文建立的引物链延伸反应性基因传感器在实验过程中的2个主要环节上均显示出高度的特异性:一是在杂交过程中[1)],二是在引物链延伸反应中均未见非特异性因素影响(图5(b)). 初步实验结果显示,引物链延伸反应性基因传感器的敏感性达10pg,而从理论上看,基因探针的碱基数愈少,检测的同源 DNA 愈大,延伸反应时间愈长,则敏感性愈高. 这揭示在参与杂交的2条链的长度相差较大、延伸反应时间充足时,引物链延伸反应性基因传感器的敏感性和其它类型的杂交法如斑点和印迹杂交相当. 此外,此种类型的传感器易经酸碱处理再生[1)],还有自动化程度高,比其它类型杂交快,也无需用放射性或非放射性物质标记的特点. 因此,应用于常规杂交分析及微量 DNA 检测等

1)本文作者待发表资料

是可行的.

此外,这种传感器,除可作为一种杂交检测法外,还有以下的潜在应用价值:(1)可用于确定外源 DNA 在人染色体 DNA 上的整合性. 通过欲整合的外源基因传感器与待确定的是否整合的人染色体 DNA 杂交,杂交后若延伸反应未显示有谐振频率的改变,即可确定未整合到染色体上. 反之,如有谐振频率的改变,则可判定已整合到染色体上. (2)从引物链延伸反应的原理看,引物链 3′端部分碱基若不与模板链碱基序列完全匹配,则经引物延伸后无谐振频率 ΔF 的变化,据此可以设计并制备有特殊碱基改变的基因探针,以期用于基因突变分析. (3)通过引物链延伸反应及据基因传感器再生特点[1)],可对已知部分序列的目的基因或已知目的基因临邻近部分序列的目的基因进行分离. (4)如果已知某基因在基因组中的精确位置,欲推断分离到的未知基因在其基因组中的位置,可以设计更多的实验去研究.

尚需指出,作为生物传感器,引物链延伸反应性基因传感器的响应时间和响应曲线,取决于杂交反应和引物链延伸反应 2 个过程. 前者我们已做过详细研究[1)];后者则有待于进一步研究、完善.

参　考　文　献

1 Graham C R, Leslie D, Squirrell D J. Gene probe assays on a fibre-optic evanescent wave biosensor. Biosensors and Bioelectronics, 1992, 7(7): 487

2 Millan K M, Mikkelsen S R. Sequence-selective biosensor for DNA based on electroactive hybridization indicators. Analytical Chemistry, 1993, 65(17): 2 317

3 Millan K M, Saraullo A, Mik kelsen S R. Voltammetric DNA biosensor for cystic fibrosis based on a modified carbon paste electrode. Analytical Chemistry, 1994, 66(18): 2 943

4 Sauerbrey G A. Use of a quartz vibrator from weighing thin an enzyme-coated piezoelectric crystal detector. Analytical Chemistry, 1983, 55: 1 682

5 陈誉华,洪文廉,陈庆学,等. 特异的 HSV DNA 酶切片段探针的制备及其应用的研究. 中国公共卫生学报,1991,10(4): 248

6 坂岡　博,本藤　良,川名　尚. PCR 法たよる单纯ヘルペスウイルスグノムの検检出と型别判定. 临床とウイルス,1990,18(13): 326

7 陈誉华,宋今丹. 一种简便而实用的 RNA 制备新方法. 中国的医学生物学研究,成都:四川科学技术出版社,1995.235

8 Maki R G, Eddy R L Jr, Byers M, et al. Mapping of the genes for human endoplasmic reticulum heat shock protein gp96/grp94. Somatic Cell and Molecular Genetics, 1993, 19(1): 73

1)本文作者待发表资料