

Goldview 标记的 DNA 荧光毛细生物传感器的研究

王艳君¹, 李永生^{2*}, 杨全玉¹, 黄焱¹, 唐静¹, 高秀峰^{1*}

1. 四川大学华西基础医学与法医学院, 四川 成都 610041

2. 四川大学化学工程学院, 四川 成都 610065

摘要 对 Goldview (GV) 作为荧光标记物的 DNA 荧光毛细生物传感器进行了研究。以荧光毛细分析法 (fluorescence capillary analysis, FCA) 为基础, 在毛细管内壁通过 Poly-L-lysine 将 20-mer-ssDNA 探针固定, 制成 DNA 荧光毛细生物传感器 (DNA fluorescence capillary biosensor, DNA-FCB), DNA-FCB 与互补靶 DNA 杂交, 通过 GV 染色后, 检测杂交产物的荧光强度, 实现对靶 DNA 的定性和定量分析。样品用量 12 μL , 靶 DNA 的浓度在 0.4 ~ 4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (2.4 ~ 24 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 范围内和荧光强度有良好的线性关系 ($y = 65.911x + 3.9944$, $r = 0.9989$); $\text{RSD} < 3.5\%$, 检出限 0.39 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (2.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 能达到定量检测靶 DNA 的目的。用 DNA-FCB 测定靶 DNA 操作简便, 试样、试剂用量少, 测定成本极低, 能大大减少环境污染。

关键词 DNA; 荧光毛细生物传感器; Goldview

中图分类号: O433.1 **文献标识码**: A **DOI**: 10.3964/j.issn.1000-0593(2009)01-0165-04

引言

核酸是生命遗传信息的载体, 对核酸序列的结构分析和测定在生命科学中具有重大的意义。目前核酸的检测方法主要有 DNA 传感器和 DNA 芯片两种。DNA 芯片^[1,2]具有高密度的特性, 可同时进行上万个基因的检测, 在功能基因组的研究中有非常重要的应用价值。但是, 由于它的制作成本高, 仪器设备昂贵目前很难普及应用。近年来, 有关 DNA 传感器的研究较多, 它具有成本低、省时、操作简单、灵敏度高、既可定性又可定量的优点, 已经成为一个新的研究热点。DNA 生物传感器根据选用的介质及换能器不同可分为电化学^[3,4]、压电晶体^[5]和光学传感器^[6-9]等多种。由于光学技术的成熟性, 在 DNA 传感器的研究中, 光学传感器一直是首选对象。我们基于荧光毛细分析法^[10-12]对脱氧核糖核酸进行了测定, 在研究中采用的是 Cy-5 靶 DNA 末端标记, 得到了满意的结果。但是, Cy-5 DNA 末端标记成本较高, 也不适合实际样品的直接测定。因此, 考虑使用双链 DNA 嵌入型荧光染料, 在 DNA 探针和靶 DNA 杂交形成双链后, 进行荧光标记。溴化乙啶 (ethidium bromide, EB)^[13,14]与 DNA 分子双螺旋的碱基之间的大沟槽结合, 产生嵌入作用, 灵敏度较高, 已有 15 年的应用历史。但是, EB 是一种强的细胞

诱变剂, 可以致癌, 使用中会导致实验仪器和环境的污染, 不利于环保, 废弃的 EB 染液必须进行特殊地净化处理, 给研究工作带来诸多不便。GV^[15]是一种近两年推出的新型核酸染料, 灵敏度与 EB 相当, 而且不具致癌性。GV 染色在紫外光源照射下与 dsDNA 结合, 呈现绿色荧光, 而与 ssDNA 结合, 呈红色荧光, 能较好地地区分 dsDNA 与 ssDNA。本研究选用 GV 作为 DNA 标记物对 DNA 荧光毛细生物传感器进行了考察。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

1.1.1 仪器和试剂

F4500 荧光分光光度仪 (日立公司), poly-L-lysine, DEPC (Sigma 公司); 琥珀酸酐、Tris 从成都科龙化工试剂厂购入; SDS、 Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、KCl、HCl、乙酸、 NaBH_4 、NaOH、EDTA、甲醇、柠檬酸钠、NaCl 购于天津化学试剂六厂; 毛细管 (直径 1.1 mm) 为四川大学华西医科大学仪器厂产品; DNA 探针: 5'-GAA ACC TGT TTG TTG GAT AC-3 和靶 DNA: 5'-GTA TCC AAC AAA CAG GTT TC-3 由北京赛百胜公司合成。

1.1.2 试剂的配制

收稿日期: 2007-08-26, 修订日期: 2007-11-28

基金项目: 教育部留学回国人员科研启动基金项目 (2300448) 和四川大学“214”振兴计划科研启动基金 (0082204127092) 资助

作者简介: 王艳君, 女, 1981 年生, 四川大学基础医学与法医学院硕士研究生 *通讯联系人 e-mail: llysgxf2005@yahoo.com.cn

DEPC 水溶液: 将 DEPC 原液用超纯水按 1 : 1 000 稀释, 37 ℃ 放置 2 h 或室温过夜, 经高压灭菌后, 室温保存。

10x TE 的配制: 量取 1 mol · L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.0) 100 mL, 0.5 mol · L⁻¹ EDTA (pH 8.0) 20 mL 加入 800 mL DEPC 水, 定容至 1.0 L, 高压灭菌后使用, 其他浓度的 TE 溶液用 DEPC 水稀释。

封闭剂的配制^[16]: 6 g 琥珀酸酐, 5.721 g 硼酸钠溶于 335 mL N-甲基-吡咯烷酮与 15 mL 的超纯水中。

氢硼化钠溶液: 300 mL 的 PBS 和 100 mL 无水乙醇的混合物中溶解 1 g NaBH₄。

1.2 DNA-FCB 的制备方法

(1) 毛细管的化学修饰和氨基化^[17]: 将毛细管在 2 mol · L⁻¹ NaOH/70% 乙醇溶液中浸泡 1 h, 1 mol · L⁻¹ HCl 浸泡过夜, 高压灭菌后, 80 ℃ 烘干。再将毛细管吸入 0.2% poly-Lysine, 45 ℃ 下旋转混合 1 h, 然后 80 ℃ 烘干。

(2) 探针的固定^[18, 19]: 将经过 poly-Lysine 修饰的毛细管吸入 20 μmol · L⁻¹ 寡核苷酸探针 12 μL, 45 ℃ 下旋转混合 1 h, 放进恒温干燥箱 80 ℃ 干燥 1.5 h, 迅速将结合有探针的毛细管浸于预冷的固定剂 (甲醇 : 乙酸 = 3 : 1) 中 5 min, 再将毛细管 80 ℃ 加热 30 min。重复上述步骤一次。将毛细管依次用下述溶液处理: 氢硼化钠溶液浸洗 3 次, 0.2% SDS 浸洗 2 次, 0.1% DEPC 水浸洗 3 次。吸入封闭剂, 47 ℃ 旋转混合封闭 15 min。分别用 95% DEPC 水和 95% 乙醇各冲洗 1 次, 制成 DNA-FCB, 吸入 1x TE, 4 ℃ 下保存备用。

(3) 靶核苷酸的检测 用 DNA-FCB 吸入含靶 DNA 的杂交液, 45 ℃ 杂交 1 h。吸入 GV 荧光染料染色 30 min, 然后, 用 0.2% SDS 浸洗 2 次, 0.1% DEPC 水浸洗 3 次, 然后吸入 TE, 在激发波长 280 nm, 发射波长 535 nm 下用 F4500 荧光分光光度仪检测杂交后的荧光强度。

2 结果与讨论

2.1 Goldview 的激发光谱和发射光谱

图 1 是嵌入型荧光染料 GV 在 F-4500 荧光分析仪上扫描的激发光谱和发射光谱。GV 有两个激发峰, 分别是 280 和 501 nm, 两个最佳激发波长下的最佳发射波长为 535 nm, 因为 501 nm 的激发波长与 535 nm 的发射波长较近, 本研究选用激发波长 280 nm, 发射波长 535 nm。

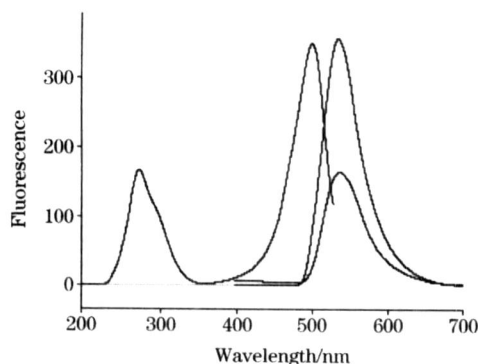


Fig 1 Excitation and emission spectrum of GV

2.2 杂交温度的优选

将 DNA-FCB 吸入 10 μmol · L⁻¹ 靶 DNA 液, 分别在 36, 42, 44, 48, 52, 56 ℃ 进行杂交反应, 之后用 5 × 10⁻⁵ 倍的 GV 避光染色 30 min, 0.2% SDS 及 0.1% DEPC 依次清洗。然后, 在激发波长 280 nm 和发射波长 535 nm 下, 利用 F4500 荧光分光光度仪测定其杂交后的荧光强度, 结果如图 2 所示。荧光强度随着温度的增高而增强, 42 ℃ 后, 荧光强度随着温度的增高而降低, 当温度为 42 ℃ 时, 荧光强度最高, 其杂交温度符合其理论计算值, 故后续的实验中均选用 42 ℃ 作为其杂交温度。

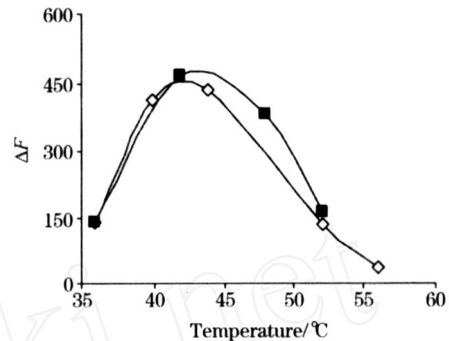


Fig 2 Effect of hybridization temperature

2.3 杂交时间的优选

用 DNA-FCB 吸入 1 μmol · L⁻¹ 的靶 DNA 液 12 μL, 在 42 ℃ 下使其分别反应 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 8 和 14 h, 然后依次测定其荧光强度, 测定结果如图 3 所示。在 2 h 之前, 随着杂交时间的延长荧光强度增强, 杂交 2 h 后荧光强度趋于稳定, 因此, 杂交时间选为 2 h。

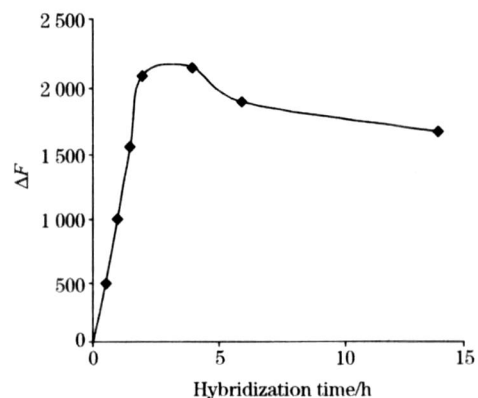


Fig 3 Effect of hybridization time

2.4 固定化探针浓度的优选

DNA 分子的空间位阻效应和静电排斥对 DNA 杂交反应会有一定的影响。为了获得最佳的杂交效果, 对探针的固定化浓度做了考察。分别用 1, 10, 20, 60 和 80 μmol · L⁻¹ 的探针制成 DNA-FCB, 在靶 DNA 的杂交浓度为 10 μmol · L⁻¹, 杂交温度为 42 ℃, 杂交时间为 2 h 的条件下, 考察了与靶 DNA 杂交后的荧光强度的关系。测定结果如图 4 所示, 探针固定浓度为 20 μmol · L⁻¹ 时, 荧光强度最高。本文选探针的固定化浓度为 20 μmol · L⁻¹。

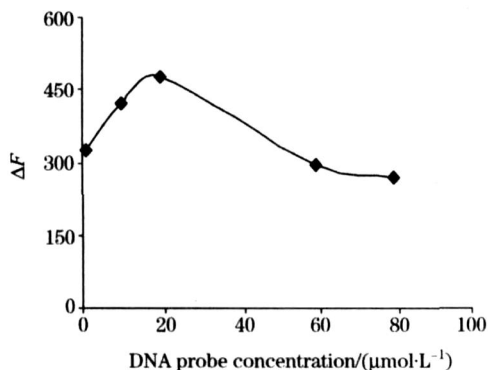


Fig 4 Effect of DNA probe concentration

2.5 GV 浓度的优选

荧光染料 GV 的浓度过高, 会造成浪费, 并且会增加 DNA-FCB 非特异性吸附, 降低检测的特异性, 浓度过低会降低测定的灵敏度, 因此对 GV 的浓度进行了优选。用 DNA-FCB 吸入 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的含靶 DNA 的杂交液按照上面优选的杂交条件进行反应, 然后用一系列稀释倍数的 GV 染色 30 min, 清洗后测定其荧光强度, 测定结果如图 5 所示。

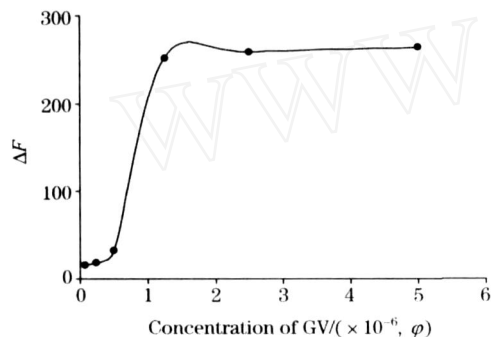


Fig 5 Effect of GV concentration

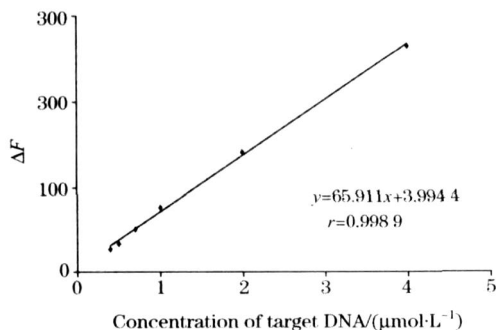


Fig 6 Calibration of target DNA

当 GV 稀释为原液的 1.25×10^{-6} () 倍时, 荧光强度达到稳定, 故 GV 的最佳染色浓度为原液的 1.25×10^{-6} () 倍。

2.6 标准曲线

在上述优选的条件下, 用 DNA-FCB 对一系列不同浓度的靶 DNA 进行测定, 测定结果如图 6 所示。靶 DNA 浓度在 $0.4 \sim 4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($2.4 \sim 24 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的范围内与荧光强度呈良好的线性关系, $y = 65.911x + 3.9944$, $r = 0.9989$ 。

2.6 DNA-FCB 的重复性

在优选的实验条件下, 测定了 9 个 DNA-FCB 对 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 靶 DNA 杂交后的荧光强度, 考察了 DNA-FCB 的重复性。测定结果如表 1 所示, 9 个 DNA-FCB 对 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 靶 DNA 测定的荧光强度平均值为 298.8, 标准差 9.2, 变异系数 3.01%。靶 DNA 的检出限为 $0.39 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($2.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。

Table 1 Test results of precision of DNA-FCB for target DNA (n = 9)

测定管号	荧光强度	平均值	SD	RSD/ %
1	299.3	298.8	9.2	3.01
2	289.9			
3	290.7			
4	279.5			
5	306.4			
6	319.9			
7	311.0			
8	299.1			
9	293.7			

3 结 论

DNA 荧光指示剂与 DNA 的结合方式主要有二种: 一种是与 DNA 分子带负电荷的核糖磷酸骨架静电结合; 另一种是嵌入 DNA 双螺旋的大小沟槽。GV 主要以第二种方式与 dsDNA 结合。毛细管内壁通过 Poly-L-lysine 将 20-mer-ssDNA 探针固定, 制成的 DNA-FCB 与互补靶 DNA 杂交、GV 染色后, 通过检测杂交产物的荧光强度, 可实现对靶 DNA 的定性和定量分析。应用该染料作为 dsDNA 的荧光标记物, 靶 DNA 用量仅需 $12 \mu\text{L}$, 靶 DNA 的浓度在 $0.4 \sim 4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($2.4 \sim 24 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 范围内和荧光强度有良好的线性关系 ($y = 65.911x + 3.9944$, $r = 0.9989$); $\text{RSD} < 3.5\%$; 检出限 $0.39 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($2.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 达到了微量检测靶 DNA 的目的。GV 作为双链 DNA 荧光指示剂构建的 DNA 检测方法灵敏度高, 样品用量少, 而且不具致癌性, 具有一定的实用性和可行性。

参 考 文 献

- [1] MA Li-ren, JIANG Zhong-hua (马立人, 蒋中华). Biochip 2 (生物芯片, 第 2 版). Beijing: Chemical Industry Press (北京: 化学工业出版社), 2002. 3.
- [2] Cheung V G, Morley M, Aguilar F, et al. Nature Genetics, 1999, 21: S15.
- [3] Natalia C Tansil, XIE Hong, XIE Fang, et al (谢红, 谢方). Analytical Chemistry, 2005, 77(1): 126.

- [4] Wang J , Palecek E , Nielsen P E , et al. J. Am. Chem. Soc. , 1996 , 118 : 7667.
- [5] Tombelli S , Sacco C , Turner A P F , et al. Anal. Chem. Acta , 2000 , 418(1) : 1.
- [6] Piunno P A E , Krull U J , Hudson R H E , et al. Anal. Chem. Acta , 1994 , 288(3) : 205.
- [7] JIANG Guang-fen , CHEN Run-sheng , YAN Hong , et al(姜广奋 , 陈润生 , 阎宏 , 等). Science in China Series C(中国科学, C 辑) , 2000 , 30(5) : 461.
- [8] ZHAI Jun-hui , HUANG Hui-jie(翟俊辉 , 黄惠杰). Chinese J. Anal. Chem. (分析化学) , 2003 , 31(1) : 34.
- [9] DU Jiang-yan , HUANG Xiao-hua , XU Fei , et al(杜江燕 , 黄晓华 , 徐飞 , 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析) , 2005 , 25(9) : 1435.
- [10] LI Yong-sheng , GAO Xiufeng(李永生 , 高秀峰). Chinese Patent(中国专利) , Application No. (申请号)200510021542. 8.
- [11] GAO Xiufeng , LI Yong-sheng , JIANG Yan-xian(高秀峰 , 李永生 , 姜艳霞). Chinese J. Anal. Chem. (分析化学) , 2006 , 34(9) : S220.
- [12] LI Yong-sheng , GAO Xiufeng(李永生 , 高秀峰) , Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析) , 2007 , 27(8) : 1565.
- [13] Lunn G , Sansone E.B. Anal Biochem. , 1987 , 162(2) : 453.
- [14] HAI Zhi-jie , SHEN Hong-wei , DENG Jun-wei(海志杰 , 沈宏伟 , 邓军卫). Practical Preventive Medicine(实用预防医学) , 2004 , 11(5) : 941.
- [15] HUANG Qing , FU Wei-ling , ZHAO Yu-hui , et al(黄庆 , 付伟灵 , 赵渝徽 , 等). China Journal of Nosocomiology(中华医院感染学杂志) , 2006 , 11(16) : 1316.
- [16] HE Qun , ZHAO Yu-jie(何群 , 赵雨杰). Hereditas(遗传) , 2004 , 26(3) : 361.
- [17] JIANG Zhong-hua , ZHANG Jin-hui(蒋中华 , 张津辉). Bulletin of Biology(生物学通报) , 2000 , 35(7) : 5.
- [18] MA Shu-hua , WANG Sheng-qi(马淑华 , 王升启). Progress in Biochemistry and Biophysics(生物化学与生物物理进展) , 2002 , 29(1) : 154.
- [19] ZHANG Hai-rong , WU Xiao-yan(张海容 , 武晓燕). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析) , 2007 , 27(2) : 346.

Research on DNA Fluorescence Capillary Biosensor Marked by Goldview

WANG Yan-jun¹ , LI Yong-sheng^{2*} , YANG Quan-yu¹ , HUANG Yi¹ , TANG Jing¹ , GAO Xiufeng^{1*}

1. West China School of Preclinical and Forensic Medicine , Sichuan University , Chengdu 610041 , China

2. School of Chemical Engineering , Sichuan University , Chengdu 610065 , China

Abstract Goldview marked DNA fluorescence capillary biosensor was studied in the present paper. Based on fluorescence capillary analysis (FCA) , the DNA biosensor uses capillary as immobilization carrier and detection carrier of DNA probe. Probes (20-mer-ssDNA) were immobilized on the inner wall of capillary by poly-L-lysine , and DNA fluorescence capillary biosensor (DNA-FCB) was made. After being hybridized with complementary target DNA and dyed by Goldview , the target DNA was qualified or quantified by detecting the fluorescence density of the Goldview using F-4500 spectrofluorometer. The sample volume was 12 μL . The concentration of the target DNA showed good linearity with the fluorescence intensity in the range of 0.4-4 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (2.4-24 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) ($y = 65.911x + 3.9944$, $r = 0.9989$). The RSD was lower than 3.5%. The concentration detection limit of the target DNA was 0.39 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (2.2 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$). The DNA-FCB can be used to qualify or quantify the target DNA. It's advantages are simplicity of manipulation , thimbleful of sample and reagent volumes , repeated use of capillary , and the lowest test cost. By using DNA-FCB to qualify the target DNA , we can consumedly decrease the pollution of the environment.

Keywords DNA ; Fluorescence capillary biosensor ; Goldview

(Received Aug. 26 , 2007 ; accepted Nov. 28 , 2007)

* Corresponding author