

酶联放大安培检测基因传感器的封闭方式

何 苗, 陈 伟, 许雄伟, 刘爱林, 林新华*

(福建医科大学药学院药物分析系, 福建 福州 350004)

摘要: 在酶联放大安培检测过程中, 酶和碱基链在金电极表面的非特异吸附是导致假阳性结果的主要来源。为减少非特异吸附, 分别从封闭时间和封闭方式等考查巯基己醇(MCH)和牛血清白蛋白(BSA)对上述非特异性吸附因素的封闭效果。结果表明, BSA 不论是对酶还是碱基链的封闭效果均优于 MCH。经优化, 确定 BSA 单一封闭剂(15 min)为最佳封闭条件, 并可用于急性早幼粒细胞白血病(PML-RAR α)融合基因的检测。本方法可有效减少非特异吸附, 缩短检测预处理时间, 并使检测信号在一定程度上得到放大。

关键词: DNA 电化学传感器; 酶联放大安培检测法; 牛血清白蛋白; 封闭

中图分类号: O657.1

文献标识码: A

DNA 电化学传感器以其结合电化学分析和核酸识别过程的特异性, 在检测 DNA 杂交方面倍受关注。由于基因水平的疾病诊断要求快速、准确地测定特定的 DNA 序列, 因而这种技术对临床疾病的诊断将产生深远的影响。DNA 电化学传感器的灵敏度是至关重要的参数, 尤其是极低含量的靶物质检测, 由于发生杂交反应的 DNA 数量极少及检测方法本身的限制, 致使产生的杂交信号往往很难与背景信号完全区分开, 利用催化反应或纳米粒子^[1-3]对杂交信号进行放大是电化学 DNA 传感器中较常用的方法。酶联放大安培检测法^[4-6]利用电极上的探针 DNA 与待测 DNA、酶标记信号探针在不同片段分别杂交, 使电极表面修饰一层酶, 其催化功能可用电化学仪器采集、放大, 从而间接测定发生杂交的 DNA 数量(见图 1)。

酶联放大安培检测技术放大检测信号, 可提高检测灵敏度, 而酶在电极表面非特异性吸附也造成“假阳性问题”。因此, 有效修饰电极表面, 减少非特异性吸附极为重要。酶联放大技术的发展, 要求封闭不仅减少 DNA 的非特异性吸附, 还要解决酶的非特异吸附。本文系统研究了巯基己醇(MCH)和牛血清白蛋白(BSA)在酶联放大安培检测技术中对 DNA 和酶非特异性吸附的封闭作用, 建立了一种快速简便、可放大信号的 BSA 封闭法。

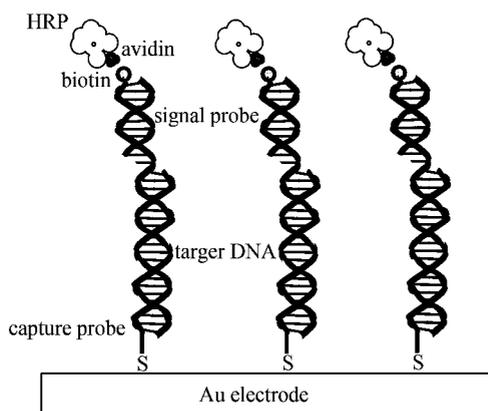


图 1 酶联放大安培检测技术示意图

Fig. 1 Scheme for the enzyme-linked amplified detection strategy: in the presence of target DNA, biotin-labeled signal probe formed "sandwich" complexes with target and capture probe anchored at the electrode surface

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

pHS-3B 型精密酸度计(上海雷磁); JB-1 型搅拌机(上海雷磁新径); BS110S 电子分析天平(Sartorius 公司); CHI660C 电化学工作站(上海辰华); 金电极(AuE \varnothing 3mm)、铂丝电极、Ag/AgCl 参比电极、饱和甘汞电极(上海辰华)。

收稿日期: 2009-10-24, 修订日期: 2009-12-22 * 通讯作者, Tel: (86-591) 22862017, E-mail: xinhua63@163.com

国家 863 计划(2006AA02Z4Z1, 2008AA02Z433), 国家自然科学基金(20675015), 福建省医学创新课题(2009-CX-17), 福建省自然科学基金项目(2007J0094) 资助

巯基己醇 (MCH, Sigma 公司), 牛血清白蛋白 (BSA, 上海国药集团化学试剂有限公司), 亲和素-辣根过氧化物酶 (Streptavidin-HRP, Roche 公司), 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB, K-Blue 原液, Neogen 公司), 吐温-20 (Tween-20, Bio basic 公司)。

PML/RAR α 捕获探针: 5'-GGT TGC TGT TGG GCA GGA AGA CTT TTT TTT TT-3', 其 3' 端用巯基修饰; 信号探针: 5'-GGT CTC AAT GGC TGC CTC CCC G-3', 其 5' 端用 biotin 标记; 探针互补链: 5'-GTC TTC CTG CCC AAC AGC AAC CAC GTG GCC AGT GGC GC C GGG GAG GCA GCC ATT GAG ACC-3', 下划线表示融合位点。实验所用序列均由大连宝生物工程有限公司合成。

溶液: 酶稀释液 (10 mmol \cdot L $^{-1}$ PBS 缓冲液, 含 150 mmol \cdot L $^{-1}$ NaCl, pH = 7.4), DNA 储备液 (10 mmol \cdot L $^{-1}$ Tris 缓冲液, 含 1 mmol \cdot L $^{-1}$ EDTA, 0.1 mmol \cdot L $^{-1}$ NaCl, pH = 8.0), 探针固定液 (10 mmol \cdot L $^{-1}$ Tris 缓冲液, 含 1 mmol \cdot L $^{-1}$ EDTA, 1 mol \cdot L $^{-1}$ NaCl, pH = 7.4), 杂交液 (10 mmol \cdot L $^{-1}$ TE 缓冲液, 含 1 mol \cdot L $^{-1}$ NaCl, pH = 7.4), 酶清洗液 (10 mmol \cdot L $^{-1}$ PB 缓冲液, 含 0.1 mol \cdot L $^{-1}$ NaCl, 0.05% tween-20, pH = 7.4), 0.5% BSA 溶液用酶稀释液配制, 4 mmol \cdot L $^{-1}$ K $_3$ Fe (CN) $_6$ /K $_4$ Fe (CN) $_6$ 溶液 (含 0.1 mol \cdot L $^{-1}$ NaCl)。

试剂均为分析纯试剂, 实验用水为二次蒸馏水。

1.2 实验方法

金电极预处理: 分别用 0.3 μ m、0.05 μ m Al $_2$ O $_3$ 粉末拌水抛光至镜面, 依次在无水乙醇、蒸馏水超声清洗。将电极置于 0.5 mol \cdot L $^{-1}$ H $_2$ SO $_4$ 中循环扫描至稳定, 二次蒸馏水清洗, 氮气吹干备用。

3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 还原电流测定: 将电极浸入 TMB 中, 在 0 V 初始电位下, 采样间隔 0.1 s, 实验时间 100 s, 记录安培电流时间曲线。

交流阻抗法: 在 4 mmol \cdot L $^{-1}$ K $_3$ Fe (CN) $_6$ /K $_4$ Fe (CN) $_6$ 溶液 (含 0.1 mol \cdot L $^{-1}$ NaCl) 中, 以开路电位为初始电位测量。

测定急性早幼粒细胞白血病 PML/RAR α 基因采用 1) 文献报道的方法^[7]: 在预处理合格的金电

极上滴涂 5 μ L 5 μ mol \cdot L $^{-1}$ 捕获探针 2 h, 用 2 mmol \cdot L $^{-1}$ MCH 封闭 2 h, 滴涂 5 μ L 混合互补链 (含 10 nmol \cdot L $^{-1}$ 互补链和 100 nmol \cdot L $^{-1}$ 信号探针) 杂交 1 h, 滴涂 3 μ L 混合酶 (0.5 U \cdot mL $^{-1}$ HRP 含 0.5% BSA) 过 15 min, 用 PB 洗液清洗后测定; 2) 新方法: 在预处理合格的金电极上滴涂 5 μ L 5 μ mol \cdot L $^{-1}$ 探针 2 h, 用 0.5% BSA 封闭 15 min, 滴涂 5 μ L 混合互补链杂交 1 h, 滴涂 3 μ L HRP 酶 15 min 后, 用酶洗液搅拌清洗 5 min 后测定。

上述实验均在室温 (25 $^{\circ}$ C) 下测试。

2 结果与讨论

2.1 酶在金电极上的非特异性吸附

图 2 示出, TMB 在金电极上的还原电流很小 (50 nA), 而因亲和素修饰酶在金电极表面吸附性很强, 催化 TMB 使之产生高达 3367 nA 还原电流。这主要来自于酶本身在电极表面的不可逆吸附以及亲和素的吸附^[8]。即便搅拌清洗也难以去除亲和素-酶在电极表面的非特异性吸附, 因此造成了修饰酶前、后的信号巨大差异 (66.7 倍)。这种吸附的存在, 很大程度影响了基因检测的正常信号。由此可知, 封闭过程对减少酶在电极表面的非特异性吸附, 提高酶联放大基因传感器性能具有重要意义。

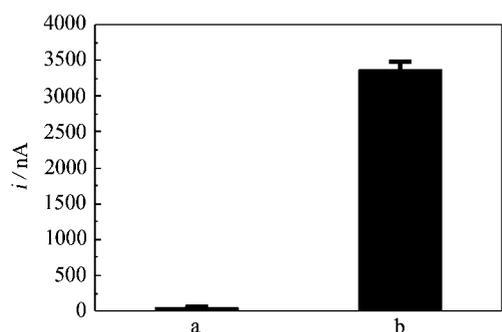


图 2 金电极吸附 HRP 前 (a) 后 (b) TMB (K-Blue 原液) 响应电流

Fig. 2 The current in TMB before and after the adsorption of HRP on Au electrode

a. bare Au electrode b. HRP/Au electrode

2.2 封闭剂

为减少酶在电极表面的吸附, 须减少酶在电极表面的结合位点。借助电极表面修饰, 改变电极表面性质, 即可达到封闭多余位点。最常用的封闭方式是 MCH、BSA 及其联用。

1) MCH

MCH 是非电活性的烷基硫醇,末端巯基可与金表面发生 Au—S 键合,由 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MCH 组装的金电极(1 h、12 h)在 TMB 中的信号分别减小至金电极的 19% 和 6.3% (图 3a, c). 这主要是烷基硫醇传递电荷效率低,导致背景信号的减小,随着组装时间延长,膜从无序演变为规则排列^[9],背景信号逐渐减小,且趋于恒定.

MCH 修饰电极后,有、无酶信号大小仍有 50 倍以上的差异(图 3). 主要原因是亲和素-酶在 MCH 自组装层修饰金表面^[10]仍强烈吸附. 说明 MCH 对酶的封闭作用不理想.

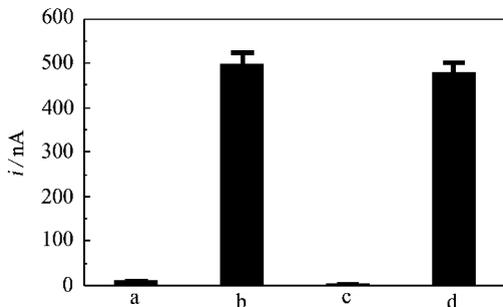


图3 经 MCH 封闭 1 h 和 12 h 的金电极吸附酶前后在 TMB (K-Blue 原液) 中的响应电流

Fig. 3 The blocking effect of MCH for the adsorption of enzyme at Au electrode

a. MCH/Au electrode (blocking for 1 h), b. Enzyme/MCH/Au electrode (blocking for 1 h), c. MCH/Au electrode (blocking for 12 h), d. Enzyme/MCH/Au electrode (blocking for 12 h)

2) BSA

BSA 为球型蛋白(分子量 66 000),等电点为 4.7^[11],不具催化氧化活性也不易与其他蛋白发生相互作用(惰性蛋白). 将金电极浸于封闭剂 0.5% BSA (15 min、1 h),该电极对 TMB 的电流响应分别比金电极增大 1.89 倍和 1.30 倍. 牛血清白蛋白在测量溶液中带负电荷,可吸引 TMB 阳离子,促进酶反应产物与电极表面间的电子跃迁. 但较长时间封闭会使电流下降,这可能由于多层组装的蛋白质空间位阻所致.

BSA 的封闭时间不同会影响 TMB 的电流响应信号,但都有很好的封闭效果,封闭时间 15 min 和 1 h 的电极,在吸附酶前、后的信号比值均约为 1.1 (图 4),说明 BSA 对酶的封闭稳定而高效. 在保证封闭效果的前提下,优化封闭时间应取 15 min 封

闭时间为宜. 可以认为:在 pH 7.4 的 PBS 溶液中,BSA 除了极少量的负电荷发生 Au—S 键合外,更多的是通过静电作用吸附在带有正电荷的金电极表面. 大分子化合物 BSA,能有效覆盖电极表面,极大程度地减少了亲和素-酶在电极表面的吸附位点,因此对酶有很强的封闭作用.

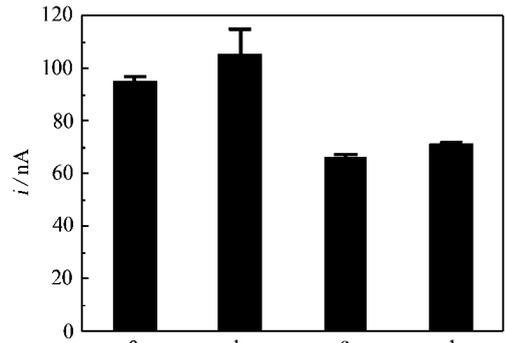


图4 BSA 封闭(15 min 和 1 h)金电极上酶前后在 TMB (K-Blue 原液)的响应电流

Fig. 4 The blocking effect of BSA for adsorption of enzyme at Au electrode

a. BSA/Au electrode (blocking for 15 min), b. enzyme/BSA/Au electrode (blocking for 15 min), c. BSA/Au electrode (blocking for 1 h), d. enzyme/BSA/Au electrode (blocking for 1 h)

图 5 示出裸电极 BSA 和酶混合封闭^[12]、BSA 单独封闭^[13]的 TMB 电流响应. 结果表明,混合封闭产生的空白信号是单一封闭的 3.67 倍,裸电极信号的 7.56 倍;而单一封闭的空白信号仅为裸电极信号的 2 倍左右. 由于单一封闭 BSA 先充分包覆在电极表面位点,削弱了亲和素-酶对吸附位点的竞争,从而封闭效果优异.

2.3 信号探针的非特异性吸附

酶联放大安培检测,信号决定于杂交信号探针的数目多少. 因此信号探针的非特异性吸附将导致检测信号误差. 信号探针由 biotin 和磷酸骨架链构成,为此考察 biotin 和磷酸骨架链的非特异性吸附,结果如下:

1) biotin 的吸附

图 6 示出裸金电极浸入 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ biotin (1 h) 的电极交流阻抗,其阻抗与裸电极的相当,可判断 biotin 电极表面吸附量很少.

2) 磷酸骨架链吸附

碱基与金之间有吸附位点,单链 DNA 可平躺吸附在金表面上^[14]. 将裸金电极浸于 $100 \text{ nmol} \cdot$

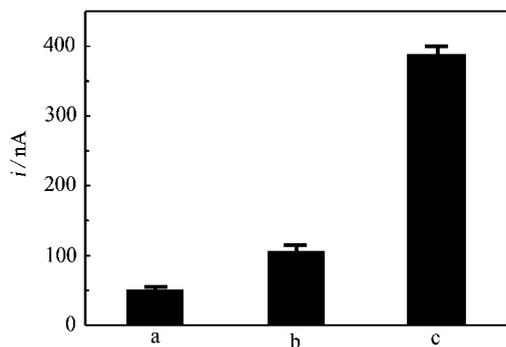


图 5 裸电极及用不同封闭方式封闭后在 TMB(K-Blue 原液) 中的电流信号

a. 裸金电极 b. 独立封闭 c. 混合封闭

Fig. 5 The current of electrode in TMB by using different blocking ways

a. bare Au electrode b. BSA as blocking reagent c. $0.5 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ HRP containing 0.5% BSA as blocking reagent

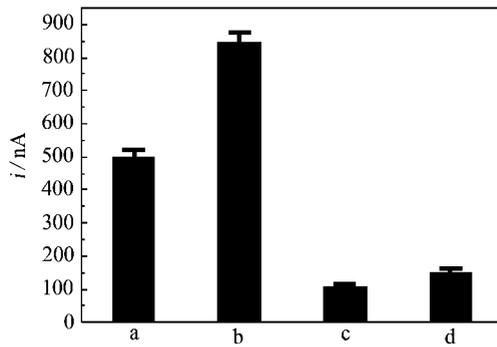


图 7 MCH 和 BSA 对 DNA 链吸附的封闭作用

a. 酶/MCH/金电极 ,b. 酶/DNA/MCH/金电极 ,c. 酶/BSA/金电极 d. 酶/DNA/BSA/金电极

Fig. 7 Blocking effect of MCH and BSA on the adsorption of DNA

a. enzyme/MCH/Au electrode ,b. enzyme/DNA/MCH/Au electrode ,c. enzyme/BSA/Au electrode ,d. enzyme/DNA/BSA/Au electrode

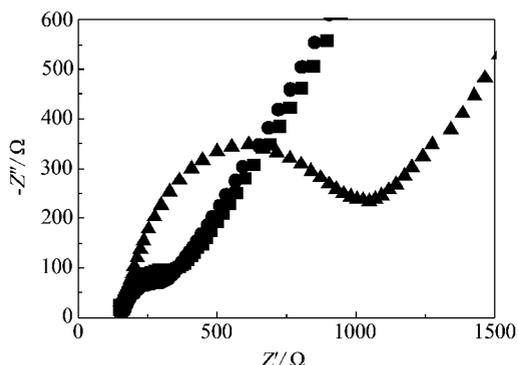


图 6 Biotin 与 DNA 在电极上非特异性吸附的阻抗

Fig. 6 The AC impedance of bare electrode and the non-specific adsorption of Biotin and DNA

electrolyte: $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ (containing $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}$)
-■- bare electrode , -●- $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ biotin ,
-▲- $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ DNA

L^{-1} 单链 DNA (1 h) , 充分洗涤 , 测量电极交流阻抗 , 其值增大至 1000Ω 左右 , 显然 , 此际电极吸附了大量 DNA.

3) MCH 和 BSA 对 DNA 链吸附

在 MCH 修饰界面上 , 由于 DNA 链吸附使电流信号增大 1.69 倍. 相比之下 , 在 BSA 修饰金电极上因 DNA 链吸附所导致的电流信号增大仅 1.39 倍 , 达到较优的封闭效果. 重要原因即在 pH 7.4 的 PBS 溶液中 , 带负电荷的 BSA , 会排斥磷酸骨架 , 更有效地在金电极表面覆盖 , 从而完全可以替代 MCH , 作磷酸骨架链的封闭剂.

2.4 急性早幼粒细胞白血病基因测定

建立 BSA 单一封闭剂的酶联放大安培检测法 , 检测急性早幼粒细胞白血病的特征融合基因序列 PML/RAR α (见信号探针序列) .

由杂交后的信号判断 (见图 8) , 采用双封闭剂法^[7]产生的完全互补信号是 153.07 nA , 为空白信号的 3.34 倍 ; 优化 BSA 单一封闭产生的完全互补

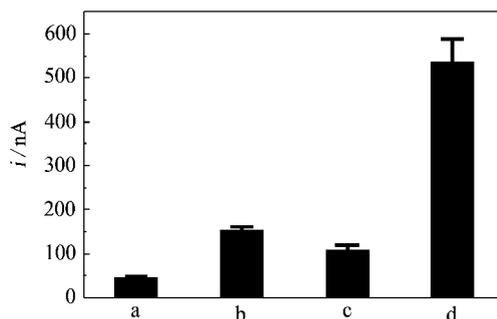


图 8 MCH-BSA 封闭法和新方法对 PML-RAR α 的检测信号比较

MCH-BSA 封闭法: a. 背景信号 b. $10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 完全互补信号

BSA 封闭法: c. 背景信号 d. $10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 完全互补信号

Fig. 8 The comparison of detection signals of PML-RAR α by using different blocking ways

MCH-BSA as blocking reagent: a. background b. after hybridization with $10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ complementary strand

BSA as blocking reagent: c. background d. after hybridization with $10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ complementary strand

信号是 535.27 nA, 为空白信号的 4.97 倍。由此可见, 无论是完全互补信号的绝对值, 还是互补和空白信号的比值, 本封闭法均优于常规的 MCH-BSA 封闭法。

3 结 论

对 DNA 链, BSA 封闭(15 min) 效果略优于 MCH 封闭(1 h) 效果; 而使用酶, BSA 单一封闭(15 min) 则其效果明显优于 MCH 封闭(1 h), 而且还对检测电流信号起到一定的放大作用。建立 BSA 单一封闭剂的酶联放大安培检测法, 封闭效果好, 缩短封闭时间, 简化步骤, 提高特异性基因片段检测的灵敏度。

参考文献(References):

- [1] Caruso F. Nanoengineering of particle surfaces [J]. *Adv Mater* 2001, 13: 11.
- [2] Storhoff J J, Mirkin C A. Programmed materials synthesis with DNA [J]. *Chem Rev* 1999, 99: 1849.
- [3] Willner I, Willner B. Functional nanoparticle architectures for sensoric, optoelectronic, and bioelectronic applications [J]. *Pure Appl Chem* 2002, 74: 1773.
- [4] Campbell C N, Gal D, Cristler N, et al. Enzyme amplified amperometric sandwich test for RNA and DNA [J]. *Anal Chem* 2002, 74: 158.
- [5] Aguilar Z P, Fritsch I. Immobilized enzyme-linked DNA-hybridization assay with electrochemical detection for *Cryptosporidium parvum* hsp70 mRNA [J]. *Anal Chem*, 2003, 75: 3890.
- [6] Patolsky F, Lichtenstein A, Willner I. Detection of single-base DNA mutations by enzyme-amplified electronic transduction [J]. *Nat Biotechnol* 2001, 19: 253.
- [7] Zhang Jiong, Lao Ruojun, Song Shiping, et al. Design of an oligonucleotide-incorporated nonfouling surface and its application in electrochemical DNA sensors for highly sensitive and sequence-specific detection of target DNA [J]. *Anal Chem* 2008, 80(23): 9029-9033.
- [8] Wang Baozhen(王保珍), Du Xiaoyan(杜晓燕), Zheng Jing(郑晶), et al. Electrochemical sensor based on immobilization of single stranded deoxyribonucleic acid on Pt electrode surface by avidin-biotin system [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学研究报告)*, 2005, 33(6): 789-792.
- [9] Poirier G E, Pylant E D. The self-assembly mechanism of alkanethiols on Au (111) [J]. *Science*, 1996, 272: 1145-1148.
- [10] Kai E, Sawata S, Ikebukuro K, et al. Detection of PCR products in solution using surface plasmon resonance [J]. *Analytical Chemistry*, 1999, 71: 796-800.
- [11] Li Meisheng(李梅生), Li Weixing(李卫星), Xing Weihong(邢卫红), et al. Adsorption of bovine serum albumin on three kinds of ceramic membrane materials [J]. *Membrane Science and Technology(膜科学与技术)* 2007, 27(5): 18-21.
- [12] Wan Ying, Zhang Jiong, Liu Gang, et al. Ligase-based multiple DNA analysis by using an electrochemical sensor array [J]. *Biosensors and bioelectronics*, 2009, 24(5): 1209-1212.
- [13] Mao Xun, Jiang Jianhui, Xu Xiangmin, et al. Enzymatic amplification detection of DNA based on "molecular beacon" biosensors [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2008, 23: 1555-1561.
- [14] Levicky R, Herne T M, Tarlov M J, et al. Using self-assembly to control the structure of DNA monolayers on gold: A neutron reflectivity study [J]. *J Am Chem Soc*, 1998, 120: 9787-9792.

Blocking Method in Enzyme-Amplified Amperometric DNA Biosensor

HE Miao , CHEN Wei , XU Xiong-wei , LIU Ai-lin , LIN Xin-hua^{*}

(*Department of Pharmaceutical Analysis , Faculty of Pharmacy , Fujian Medical University ,
Fuzhou 350004 , China*)

Abstract: Non-specific absorption of enzyme and nucleotide is a main source leading to the background staining in enzyme-amplified amperometric detection of DNA. To eliminate the background staining in this system , the blocking procedure by mercapto-hexanol (MCH) and bovine serum albumin (BSA) was studied systematically. The results show that the anti-fouling effect of BSA is better than that of MCH. A simple and efficient blocking strategy employing BSA as the sole blocking reagent was established and applied in the detection of PML-RAR α fusion gene in acute promyelocytic leukemia. It can effectively eliminate the background staining , shorten the pre-processing time and achieve strong signal amplification.

Key words: electrochemical DNA sensor; enzyme-amplified amperometric assay; bovine serum albumin; blocking