

· 实验研究 ·

毛细管内均相辣根过氧化物酶(HRP)与核酸杂交偶联 HRP 催化化学发光比较研究*

向安 汪钦 包晗 颜真 郭晏海[△]

(第四军医大学全军基因诊断技术研究所 陕西 西安 710032)

摘要 目的:了解毛细管内核酸偶联和游离辣根过氧化物酶(HRP)催化化学发光差异。**方法:**不同浓度 HRP 和经核酸杂交固定于毛细管内壁 HRP 催化化学发光反应。**结果:**①游离 HRP 催化化学发光线性检测范围窄(2.7×10^{-5} - 1.3×10^{-6} mg/ml, $R^2 > 0.96$),下限为 1.0×10^{-7} mg/ml;② 2.0×10^{14} - 2.0×10^6 copies/ml 的 5 μ l 单链 DNA 杂交后,1.0-10min 时 DNA 浓度 M 对数($\lg^M$)与化学发光 I 值线性相关($R^2 > 0.99$),且大于阴性 I 值平均数 +3 倍标准偏差(s.d);③ 5.0×10^{11} - 5.0×10^6 copies/ml 的 5 μ l PCR 产物杂交后,10min 内 PCR 产物对数 $\lg^M$ 与 I 值线性相关($R^2 > 0.97$),且大于阴性 I 值平均数 +3 倍标准偏差(s.d)。4.0-7.0min 内 $\lg^M$ 与 I 值的 $R^2 > 0.99$,3 次平行检测标准偏差 $< 5.0\%$ 。**结论:**毛细管内核酸杂交的 HRP 催化化学发光检测线性范围宽、灵敏度高、底物用量少,有望用于临床核酸分子杂交检测。

关键词 微体系 固定化酶 辣根过氧化物酶 化学发光

中图分类号 D657.8 Q814 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2011) 05-857-04

Differences between coupling of nucleic acid hybridization and catalytic chemiluminescence of free horseradish peroxidase in capillary tube*

XIANG An, WANG Qin, BAO Han, YAN Zhen, GUO Yan-hai[△]

(Department of Pharmacogenomics, School of Pharmacy, Fourth Military Medical University, 710032, Xi'an China)

ABSTRACT Objective: To investigate the characteristic of chemoluminescence under the catalytic effects of Horseradish peroxidase (HRP) in capillary tube. **Methods:** Different concentration of HRP that free or conjugated to capillary tube by nucleic acid hybridization been used to catalyze chemiluminescence reaction. **Results:** ① The linear range of the free HRP was limited (2.7×10^{-5} - 1.3×10^{-6} mg/ml, $R^2 > 0.96$), and the absolute detection limit was 1.0×10^{-7} mg/ml. ② The chemiluminescence detected value (I) was higher than the sum of means of there background observations and triple standard deviations(s.d), and had a positive linear correlation with the level of logarithmic DNA concentration ($R^2 > 0.99$), when DNA sequences from 2.0×10^{14} to 2.0×10^6 copies/ml. ③ From 5.0×10^{11} to 5.0×10^6 copies/ml, the logarithmic value of concentration ($\lg^M$) of 5 μ l products of PCR was higher than the sum of means of there background observations and triple standard deviations(s.d), and had a positive linear correlation with the value(I), $R^2 > 0.97$. In addition, within 4.0-7.0min, $R^2 > 0.99$, and the relative standard deviation is less than 5.0%. **Conclusion:** This study suggest that the chemiluminescence detection of nucleic acid hybridization in capillary tube with catalyze of HRP is a rapid, simple, and micro-nucleic acid detection technology with sensitivity and specificity, hence, might be clinically used in the future.

Key words: mini-system; immobilized enzyme; Horseradish peroxidase; chemiluminescence

Chinese Library Classification: O657.8 Q814 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)05-857-04

前言

毛细管核酸杂交是一种半封闭微体系、不易污染、反应迅速^[1],有望用于快速诊断^[2]。化学发光检测线性范围宽、高灵敏度、快速检测和设备简单等特点^[3],在药物^[4]、临床^[5-7]、核酸^[8,9]、环境^[10]和材料^[11]分析中已有很好的应用。酶催化化学发光的核酸检测灵敏度可达放射性元素检测水平^[12]。我们试图把毛细管

微体系核酸杂交和酶促化学发光检测相结合,研发出可用于快速临床诊断的微量核酸检测方法。但是,与酶联免疫吸附^[13]、膜表面核酸杂交^[14]不同,毛细管容积十分有限。为此,本文应用增强型化学发光底物^[15]进行了游离辣根过氧化物酶(HRP)和核酸偶联的 HRP^[16]催化化学发光比较研究,探明毛细管核酸杂交酶促化学发光检测的可行性。

* 基金项目 国家“十一五”“艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”科技重大专项(2009ZX10004-311)、陕西省自然科学基金项目 (2009JM4005)。

作者简介 向安 (1983),男,硕士,湖南辰溪人,E-mail: xiangan0725@126.com

[△]通讯作者 郭晏海,第四军医大学药学院药物基因组学教研室,联系电话 029-84774772,Email: gyanhai@fmmu.edu.cn

(收稿日期 2010-12-05 接受日期 2010-12-28)

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

PCR 反应试剂 (大连宝生物工程有限公司), 寡核苷酸探针、单链 DNA 靶序列 (上海生工生物有限公司), 化学发光法生物素标记核酸检测试剂盒、辣根过氧化物酶标记 Streptavidin (上海碧云天生物技术有限公司), 分析纯硅烷化试剂及其他化学试剂 (美国 SIGMEA 公司), 核酸探针标记的玻璃毛细管 (内径 $300\mu\text{m}$, 自制)。

1.2 主要试验仪器

核酸杂交仪 (美国 UVP 公司)、MJ Research V2.0 PCR 仪 (美国 MJ Research 公司)、毛细管化学发光分析仪 (西安天隆科技有限公司)。

1.3 实验方法和步骤

1.3.1 游离 HRP 催化化学发光检测 HRP 增强化学发光底物 BeyoECL Plus A、B 与终浓度为 3.3×10^{-4} – $1.3 \times 10^{-7}\text{mg/ml}$ 的 HRP 共 $5.0\mu\text{l}$ 在毛细管内用化学发光分析仪检测化学发光 I 值。

1.3.2 单链 DNA 靶序列杂交化学发光检测 2.0×10^{14} – $2.0 \times 10^4\text{copies/ml}$ 标记生物素的 100-mer 单链 DNA 靶序列与毛细管内壁固定的特异寡核苷酸探针于 42°C 杂交 45min; 依次用 $1.5\text{ml } 2 \times \text{SSC}, 0.1\% \text{SDS}$; $1.5\text{ml } 0.1 \times \text{SSC}, 0.1\% \text{SDS}$ 于 55°C 洗脱; 经 SA-HRP 在 37°C 下偶联 20min 后 5ml PBS (pH=7.0) 洗

脱, 用 BeyoECL Plus A、B 液经化学发光分析仪检测化学发光 I 值。以此靶序列与非特异探针的杂交反应作阴性对照。

1.3.3 PCR 产物杂交化学发光检测 生物素标记的 150bp 的不对称 PCR 产物变热性后与探针进行毛细管杂交, 按方法 2 进行化学发光法进行检测 I 值。以此 PCR 产物与非特异探针的杂交反应作阴性对照。

1.4 统计学分析 各分组所得计量数据采用 SPSS 统计软件和 Origin7.0 科学绘图软件完成三次平行实验的化学发光 I 值平均数、方差和线性相关分析。

2 结果

2.1 游离辣根过氧化物酶均相化学发光检测

长 10cm 、内径 $200\mu\text{m}$ 毛细管中, $5\mu\text{l}$ 各浓度游离 HRP 催化化学发光 I 值 (图 1)。 $\textcircled{1}$ HRP $> 2.7 \times 10^{-5}\text{mg/ml}$, 初始化学发光 I 值 > 9999 (仪器检测上限), 但 5 分钟内迅速下降为零; $\textcircled{2}$ HRP 浓度为 2.7×10^{-5} – $1.3 \times 10^{-6}\text{mg/ml}$ 时, 检测时段 0.3–10min 时化学发光 I 值与 HRP 浓度线性相关系数 $R^2 > 0.97$, 而各检测时段拟合直线斜率逐一减小, 检测初始时的分辨率较高 (图 2); $\textcircled{3}$ HRP 浓度 $\leq 6.7 \times 10^{-7}\text{mg/ml}$ 时, 化学发光 I 值趋于底物背景 I 值平均数 +3 倍标准偏差 (s.d.) 之和 51.1。结果表明, 高浓度游离 HRP 催化的瞬时光强度大, 但衰减迅速、持续时间短, 低浓度时瞬时光强度下降, 衰减减缓、持续时间延长, 线性检测范围窄 (2.7×10^{-5} – $1.3 \times 10^{-6}\text{mg/ml}$), 检测下限为 $1.0 \times 10^{-7}\text{mg/ml}$ 。

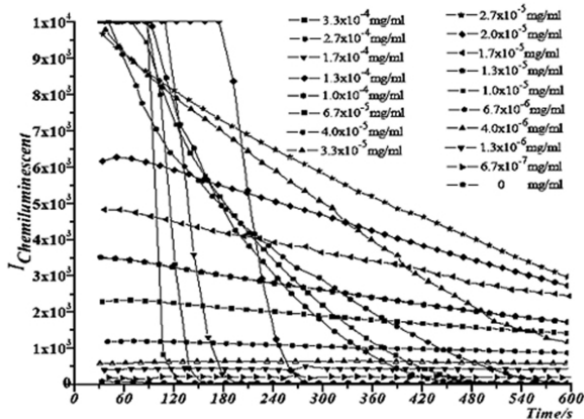


图 1 毛细管微体系游离 HRP 催化化学发光 I 值变化图

Fig.1 The detected value (I) of chemiluminescence under the catalysis of free Horseradish Peroxidase (HRP) in capillary tube over time.

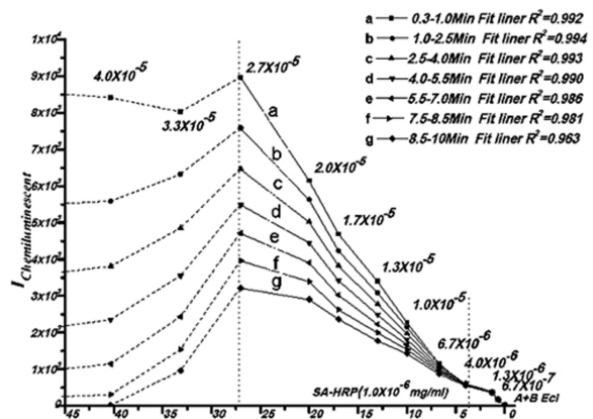


图 2 不同检测时段化学发光 I 值随游离 HRP 浓度变化图

Fig.2 The detected value (I) of chemiluminescence changes with the concentration of free HRP in the different time.

2.2 单链 DNA 靶序列杂交后化学发光检测

100mer 单链 DNA 靶序列的毛细管核酸杂交化学发光 I 值变化 (图 3)。 $\textcircled{1}$ 单链 DNA 浓度为 $2.0 \times 10^6\text{copies/ml}$ 时, 初始 I 值为仪器检测上限 9999, 10Min 衰减为 3538; 浓度为 $2.0 \times 10^4\text{copies/ml}$, 初始 I 值为 1396, 10Min 为 388。即高浓度单链 DNA 瞬时化学发光强度大、衰减快, 低浓度的瞬时化学发光强度小、衰减慢; $\textcircled{2}$ 单链 DNA 浓度 M 为 2.0×10^{14} – $2.0 \times 10^6\text{copies/ml}$ 时, 其对数 $\lg M$ 与 I 值在检测时段 1.0–10min 的线性相关系数 R^2 依次为 0.99, 各时段拟合直线斜率逐一减小, 即检测初始时灵敏度最高 (图 4); $\textcircled{3}$ $2.0 \times 10^6\text{copies/ml}$ 单链 DNA 浓度为时, 10min 内 I 值平均 1197.9, 比 10 分钟内非特异杂交

化学发光 I 值平均数 +3 倍标准偏差 (s.d.) 之和 941.9 要高, 低于此浓度的 DNA 靶序列化学发光 I 值在检测 2Min 后与阴性 I 值接近。结果表明, 毛细管微体系内单链 DNA 靶序列偶联 HRP 催化化学发光特征与游离 HRP 明显不同。1.0–10Min 内 2.0×10^{14} – $2.0 \times 10^6\text{copies/ml}$ 单链 DNA 浓度 M 的对数 $\lg M$ 与 I 值线性相关, $R^2 > 0.99$ 。且各 I 值均大于阴性 I 值平均数 +3 倍标准偏差 (s.d.)。

2.3 PCR 产物杂交后化学发光检测

浓度为 5.0×10^{11} – $5.0 \times 10^4\text{copies/ml}$, 长为 150bp 的不对称 PCR 扩增产物经热变性后在毛细管内核酸杂交化学发光 I 值变化特征 (图 5)。 $\textcircled{1}$ 与单链 DNA 靶序列类似, 高浓度 PCR 产

物的瞬时化学发光强度大、衰减快,而低浓度的瞬时化学发光强度小、衰减慢;② PCR 产物为 5.0×10^{11} - 5.0×10^4 copies/ml 时,其对数值 $\lg^M$ 与 I 值在 0.3-10min 内的线性相关系数 $R^2>0.985$ 。③ 5.0×10^6 copies/ml 的 PCR 产物 I 值平均高于近非特异杂交 I 值平均数 +3 倍标准偏差(s.d),低于此浓度的 I 值与阴性接近。结果表明,毛细管微体系 PCR 产物和单链 DNA 杂交

有相似的化学发光特征。10min 内, 5.0×10^{11} - 5.0×10^6 copies/ml 的 $5\mu\text{l}$ 热变性 PCR 产物杂交后的 I 值与对数 $\lg^M$ 线性相关($R^2>0.985$),且各 I 值均大于阴性 I 值平均数 +3 倍标准偏差(s.d)。4.0-7.0Min 内 $\lg^M$ 与 I 值的 $R^2>0.99$,检测灵敏度为 10 倍 DNA 靶序列的 I 值相差 50 以上,3 次平行检测标准偏差 $>5.0\%$ 。

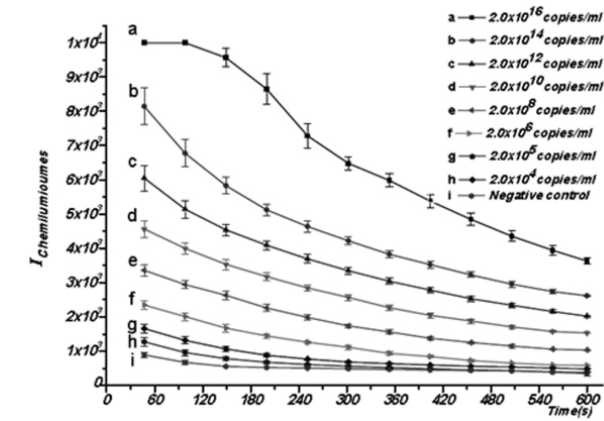


图 3. 单链 DNA 靶序列杂交化学发光 I 值随时间变化图

Fig.3The detected value (I) of chemiluminescence under the catalysis of HRP immobilized in capillary tube with single-stranded DNA over time.

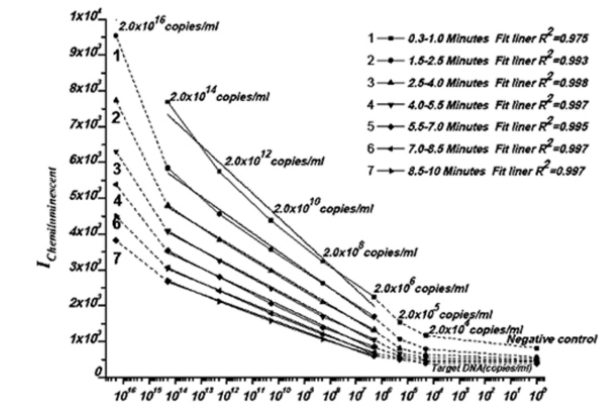


图 4. 不同检测时间段内化学发光 I 值随单链 DNA 靶序列浓度变化图

Fig.4The changes of detected value (I) of chemiluminescence under the catalysis of HRP immobilized in capillary tube with single-stranded DNA in the different time.

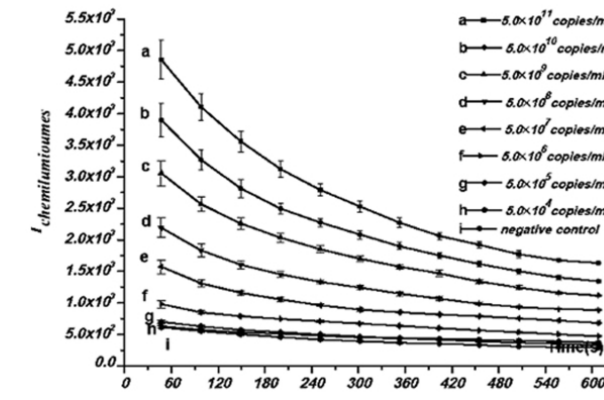


图 5.PCR 产物杂交后化学发光 I 值随时间变化图

Fig.5The detected value (I) of chemiluminescence under the catalysis of HRP immobilized in capillary tube with the product of polymerase chain reaction (PCR) by nucleic hybridization over time.

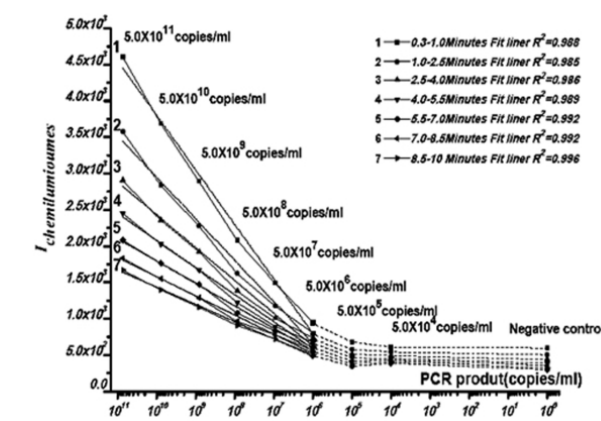


图 6.不同检测时间段内化学发光 I 值随 PCR 产物浓度变化图

Fig.6The changes of detected value (I) of chemiluminescence under the catalysis of HRP immobilized in capillary tube with PCR products in the different time.

3 讨论

3.1 游离与杂交后偶联 HRP 催化化学发光差异分析

游离和杂交后偶联 HRP 催化化学发光的最大差异在于前者线性检测范围窄而后者线性检测范围宽。毛细管内游离 HRP 化学发光线性范围较窄(2.7×10^{-5} - 1.3×10^{-6} mg/ml),与文献报道[17, 18]大致相当,甚至更窄。①均相反应体系空间位阻小,底物与 HRP 催化中心较易结合。游离 HRP 浓度高时,瞬时反应速率大,毛细管内底物的量有限,所以初始发光强度大,继而又迅速衰减;②低浓度游离 HRP 时,只有靠近酶催化中心的底物发生化学发光反应,而远离 HRP 的底物需经分子碰撞接近 HRP 催

化中心。催化反应发生率随 HPR 浓度降低而变小,而瞬时底物消耗量也相对较少。因此,低浓度游离 HPR 反应体系中瞬时化学发光值小,持续发光时间长。毛细管内偶联 HRP 化学发光达到 105 的线性范围。①毛细管固定 HRP 因电荷斥力而在管壁不远处形成一个 HRP 表壁,即此反应体系中绝大多数反应底物远离于此 HRP 催化表面。化学发光底物只能单向扩散以接近 HRP 分子,下一个底物分子通过碰撞运动靠近酶分子时还需克服前底物的位阻才能到达催化中心;②毛细管固定 HRP 催化化学发光集中于在一表面上,所产生的光子可被分析仪更充分的收集。因此较长时段内有较高的化学发光强度检测值,此特点在开放式表面固定酶促化学发光研究中有报道

[19]。毛细管内固定化酶的方法不仅运用了微反应体系的反应快、效率高的优点,还减少了酶的用量,增强了酶的稳定性,因而弥补了其价格昂贵、易失活的缺点。另外,毛细管的半封闭式反应环境使得于内壁固定的酶不易泄露,整个反应体系相对独立,减少了平行样品间相互干扰。

3.2 单链 DNA 靶序列与 PCR 产物核酸杂交化学发光特征差异分析

人工合成的单链 DNA 靶序列是一种较理想化短片段杂交靶分子,且杂交体系无其他干扰离子参与。不对称 PCR 产物则不然,①不对称 PCR 产物热变性后的单链化效率有限;②PCR 产物序列较单链 DNA 靶序列更长,杂交空间位阻大,不易接近探针;③用于杂交的未纯化 PCR 产物含有 PCR 反应液中各种离子和大分子物质,因而可能对杂交造成干扰。因此,本实验中相同浓度单链 DNA 靶序列的化学发光 I 值较 PCR 产物高。即使如此,本实验 PCR 产物杂交效率已满足检测要求。PCR 产物直接用于核酸杂交也已有较多报道^[20]。

目前,毛细管微体系核酸杂交酶促化学发光检测技术国内外报道甚少,它是一种综合了微反应体系、DNA 核酸杂交和酶促化学发光检测优点的新技术。本研究组人员正致力于完善各不足之处,使其成为一种高自动化、大通量、可连续检测的临床快速诊断技术。

参考文献(References)

- [1] Liu Y, Li Y. An antibody-immobilized capillary column as a bioreactor for detection of Escherichia coli O157: H7 with absorbance measurement [J]. Anal. Chem. 2001, 73(21): 5180-5183
- [2] 李晓霞,申丽华,漆红兰. 毛细管固定过氧化物酶流动注射化学发光法测定过氧化氢的研究[J]. 分析测试学报. 2008,27(4): 419-422
Li Xiao-xia, Shen Li-Hua, Qi Hong-Lan, et al. Determination of Hydrogen Peroxide on a Peroxidase-immobilized Capillary Column by Flow-injection Chemiluminescence [J]. Journal of instrumental analysis, 2008, 27(4): 419-422(In Chinese)
- [3] 胡哲,尹继刚,姜宁,等. 化学和生物发光的原理及其在生命科学中的应用[J]. 中国兽医学报. 2008(6)
Hu Zhe, Yi Ji-Gang, Jiang Ning, et al. the application and principle of chemiluminescence in the study of life science [J]. Chinese journal of veterinary science. 2008(6)(In Chinese)
- [4] 王瑛. 核酸的非同位素化学发光分析系统 [J]. 生物工程进展. 1995, 15(3): 18-24
Wang Ying. The methodology of nonradioactive labeling and detection systems of nuclei [J]. progress in biotechnology, 1995, 15(3): 18-24. (In Chinese)
- [5] Jordan T, Walus L, Velickovic A, et al. A competitive chemiluminescent enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of RMP-7 in human blood* 1 [J]. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. 1996, 14(12): 1653-1662
- [6] Gold B, Radu D, Balanco A, et al. Diagnosis of Fragile X syndrome by Southern blot hybridization using a chemiluminescent probe: a laboratory protocol [J]. Molecular Diagnosis. 2000, 5(3): 169-178
- [7] Nakano K, Nakao T, Schram K H, et al. Urinary excretion of modified nucleosides as biological marker of RNA turnover in patients with cancer and AIDS[J]. Clinica Chimica Acta. 1993, 218(2): 169-183
- [8] Duffy M J. Can molecular markers now be used for early diagnosis of malignancy [J]. Clinical chemistry. 1995, 41(10): 1410
- [9] Girotti S, Ferri E, Ghini S, et al. Direct quantitative chemiluminescent assays for the detection of viral DNA [J]. Analytica Chimica Acta. 1991, 255(2):387-394
- [10] Tsukagoshi K, Jinno N, Nakajima R. Development of a micro total analysis system incorporating chemiluminescence detection and application to detection of cancer markers [J]. Anal. Chem. 2005, 77(6):1684-1688
- [11] Bowie A R, Achterberg E P, Mantoura R, et al. Determination of sub-nanomolar levels of iron in seawater using flow injection with chemiluminescence detection [J]. Analytica Chimica Acta. 1998, 361(3):189-200
- [12] Huang B, Li J, Cheng J. On-line chemiluminescence detection for capillary ion analysis [J]. Anal. Chem. 1996, 68(14):2366-2369
- [13] Arnold Jr L J, Hammond P W, Wiese W A. Novel assay formats employing acridinium ester-labeled DNA probes [J]. Clin Chem. 1989, 35:1588-1594
- [14] 李红梅,陈佳,徐斐,等. ELISA 测定中 TMB 显色体系的优化及其稳定性研究[J]. 生物技术通报. 2010(2):126-130
Li Hong-Mei, Chen Jia, Xu Fei, et al. Optimization of TMB Substrate Chromomeric System in ELISA and the Study of Its Stability in Storage [J]. Biotechnology bulletin. 1983, 305 (158-159): 305 (In Chinese)
- [15] Renz M, Kurz C. A colorimetric method for DNA hybridization [J]. Nucleic Acids Research. 1984, 12(8): 3435
- [16] Whithead T P, Thorpe G, Carter T, et al. Enhanced luminescence procedure for sensitive determination of peroxidase labeled conjugate in immunoassay [J]. Nature. 1983, 305(158-159): 305
- [17] Guo Z, Guilfoyle R A, Thiel A J, et al. Direct fluorescence analysis of genic polymorphisms by hybridization with oligonucleotide arrays on glass supports[J]. Nucleic Acids Research. 1994, 22(24): 5456
- [18] 张文艳,周延秀. 增强辣根过氧化物酶催化鲁米诺化学发光反应的新型增强剂四苯硼钠[J]. 分析化学. 1998, 26(1): 100-102
Zhang Wen-Yan, Zhou Yan-Xu. Sodium tetraphenyl borate: a new type of chemiluminescence enhancer for horseradish peroxidase catalyzed oxidation of luminol [J]. Chinese journal of analytical chemistry. 1998, 26(1): 100-102(In Chinese)
- [19] 杨秀岑,伍莉萍. 用化学发光法测定辣根过氧化物酶几种体系的研究[J]. 华西医科大学学报. 1990, 21(3): 293-297
Yang Xu-Can, Wu Li-Ping. Study on several systems used for chemiluminescent determination of Horseradish Peroxidase [J]. Journal of west China University of medical sciences. 1990, 21(3): 293-297(In Chinese)
- [20] 杨维平,章竹君. 固体表面发光法测定辣根过氧化物酶的研究[J]. 陕西师大学报:自然科学版. 1995, 23(2): 59-61
Yang Wen-Ping, Zhang Zhu-Jun. Reducing the background of the solid surface chemiluminescence substrate [J]. Journal of Shaanxi normal university (natural science edition). 1995, 23 (2): 59-61(In Chinese)
- [21] 王国青,程京. 生物芯片技术与基础医学研究[J]. 基础医学与临床. 2000, 20(4): 5-7
Wang Guo-Qing, Cheng Jing. The technology of biochip and basic medicine [J]. Basic medical sciences and clinics. 2000, 20(4): 5-7(In Chinese)