适配体在受体和分子传感器中的应用研究进展

陈芳明¹, 陈炜¹, 王健¹, 杜立萍¹, 吴春生^{1,2*}, 王平^{2*}

1. 西安交通大学医学部基础医学院生物物理学系, 医学工程研究所, 西安 710061;

2. 浙江大学生物医学工程与仪器科学学院, 生物传感器国家专业实验室, 生物医学工程教育部重点实验室, 杭州 310027

* 联系人, E-mail: wuchunsheng@xjtu.edu.cn; cnpwang@zju.edu.cn

收稿日期: 2018-04-25; 接受日期: 2018-05-21; 网络版发表日期: 2018-06-13

国家自然科学基金(批准号: 31470956, 31661143030, 31700859)资助

摘要 适配体是从随机寡核苷酸文库中筛选得到的一类可以结合特异靶分子的寡核苷酸序列, 在生物医学中具有极其诱人的应用前景. 与传统抗体相比, 由于具有制备简便、易于修饰、稳定性好, 以及结合目标物范围广等特点, 适配体已广泛应用于生物传感器的开发, 一方面可以用作敏感元件, 用于实现对靶分子的识别和检测; 另一方面, 可以作为敏感元件与传感器件耦合的桥梁, 提高耦合的效率. 此外, 近年来在基于适配体的生物传感器中引入各种纳米材料例如金属纳米颗粒、碳材料和功能性纳米球等也促进了基于适配体的生物传感器在分析性能和商业应用等方面的提升和改进. 本文首先简要介绍了基于SELEX技术筛选适配体的方法, 总结了适配体的基本特性; 其次, 详细概括和总结了适配体生物传感器的基本原理及其分类; 随后, 结合近年来基于适配体的生物传感器领域的最新研究成果, 重点介绍了适配体在生物传感器开发中的应用, 主要包括在仿生嗅觉与味觉受体传感器方面的应用以及在检测小分子物质和蛋白质的应用; 最后, 对适配体在生物传感器中的应用面临的问题及其发展趋势进行了分析和展望.

关键词 适配体, 敏感元件, 生物传感器, 分子传感器, 受体传感器

适配体是一类用指数富集方法(systematic evolution of ligands by enrichment, SELEX)从随机寡核苷酸文库中筛选得到的一类可以结合特异靶分子的寡核苷酸序列. 该序列可以是RNA、双链DNA (double stranded DNA, dsDNA)或单链DNA (single stranded DNA, ssDNA)^[1], 因此, 适配体也称为核酸适配体.

核酸适配体能够识别其靶分子并与之相互作用的性质称为核酸适配体的特异性. 当前, 用于特异性适配体筛选的主要是基于SELEX技术的体外筛选方法.

SELEX技术于1990年由Ellington和Tuerk等建立, 是一种在化学合成、PCR技术, 即聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)以及基因测序等技术基础上建立起来的体外筛选获得特异性核酸适配体的基本方法. SELEX技术体外筛选核酸适配体的基本原理如图1所示. 首先, 从一个化学合成的随机寡核苷酸文库中, 加入靶标分子与随机序列的寡核苷酸分子相互作用, 然后洗脱除去与靶标非特异性结合的寡核苷酸分子, 分离与靶标特异性结合的寡核苷酸分子, 并以此寡核

引用格式: 陈芳明, 陈炜, 王健, 等. 适配体在受体和分子传感器中的应用研究进展. 中国科学: 生命科学, 2018, 48: 618–629

Chen F M, Chen W, Wang J, et al. The application of aptamers in receptor- and molecule-based biosensors (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2018, 48: 618–629, doi: 10.1360/N052017-00123

图 1 SELEX技术筛选核酸适配体的基本流程(网络版彩图)

核苷酸分子作为模板进行PCR扩增. 能够与靶标分子特异性结合的寡核苷酸分子经过PCR扩增后, 作为下一轮筛选的随机文库, 再次进行筛选, 经过一轮或者多轮筛选和富集后, 最终获得能够与靶标分子特异性结合的目标核酸适配体. 得到与靶标分子具有高亲和力的目标核酸适配体文库后, 将文库进行克隆和测序, 得到该靶标分子核酸适配体的碱基序列, 进而单克隆核酸适配体, 再进一步检测得到的单克隆核酸适配体与其靶标之间相互作用亲和力大小和特异性^[2,3].

核酸适配体对靶分子的高特异识别能力, 使其具备类似于抗体的性质并具有一些优于抗体的优点. 具体包括以下4点: (i) 适配体是通过体外筛选, 适配体SELEX筛选周期一般为2~3个月, 最快的只需2周, 而制备单克隆抗体则至少需要3~6个月, 且成本昂贵; (ii) 适配体是通过化学法合成的, 因而可以在适配体上灵活修饰多种基团, 使其具有多种功能; (iii) 抗体的蛋白本质决定了它容易变性, 传统免疫生物传感器化学和物理性质的不稳定限制了生物传感器的应用范围, 而适配体具有化学稳定性, 在pH 2~12的宽范围内保持稳定, 并具有一定的热复性; (iv) 适配体组成简单, 一般由几十个核苷酸(少于100 nt)组成, 因而适配体的设计相对简单. 由于适配体拥有抗体无法比拟的优势, 利用适配体设计生物传感器对病原微生物进行

识别和检测, 具有极其重要的意义^[4].

适配体可以识别的靶分子的范围非常广, 包括无机离子、有机小分子、核酸、蛋白质、细胞、组织, 甚至器官, 都有可能是核酸适配体的靶分子. 此外, 适配体传感器还涉及如何将探针DNA修饰到传感器表面上. 目前适配体固定技术主要有以下几种方法, 即吸附法、共价键和、自组装、亲和素-生物素反应系统固定法和组合法等^[5,6]. 尽管基于核酸适配体的检测技术还处于初始阶段, 但其优点已经在目前的许多应用中得到充分的体现, 适配体已广泛应用于生物传感器的开发, 一方面可以用作敏感元件, 用于实现对目标分子的识别和检测; 另一方面, 可以作为敏感元件与传感器耦合的桥梁, 提高耦合的效率.

本文首先介绍了基于SELEX技术筛选适配体的方法, 总结了适配体的基本特性; 其次, 详细概括和总结了适配体生物传感器的基本原理、不同的分类, 以及传感器表面固定适配体的方法; 随后, 结合近年来基于适配体的生物传感器领域的最新研究成果, 较详细地概括和总结了适配体在生物传感器开发中的应用, 主要根据适配体所结合的靶标分子不同, 将从嗅觉、味觉及蛋白等适配体所结合的靶分子来分别阐述适配体在传感器中的作用. 最后, 对适配体在生物传感器中的应用面临的问题及其发展趋势进行了分析和展望.

1 核酸适配体生物传感器的基本原理与分类

核酸适配体的出现为生物分析方法和传感器的设计开发开辟了新的思路. 目前, 核酸适配体已被应用于生物医学基础研究、诊断学和药物研究等方面, 是未来生物监测技术的发展方向. 研究者们已经成功开发了大量基于核酸适配体的分析新方法, 包括比色法、压电法、表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)技术、荧光法、电化学技术等. 由于具有传统的生物化学传感器所不具备的许多优点, 核酸适配体传感器是当前研究的一个热点, 为提高传感器的特异性、灵敏度、动态范围和高信号-背景比提供了新的途径. 目前构建核酸适配体传感器的策略一般是先让核酸适配体固定到检测器件(如电极)上, 通过检测核酸适配体与目标分子特异结合前后器件输出信号的变化来实现对目标分子的检测. 本文将核酸适配体生物传感器归结为三大类进行总结, 分别是亲和型核酸适配体生物传感器、构型变换型核酸适配体生物传感器和其他核酸适配体生物传感器.

1.1 亲和型核酸适配体生物传感器

亲和型生物传感器的基本策略是利用核酸适配体和目标分子间特异的亲和力直接设计. 这种核酸适配体传感器主要基于电化学的原理进行检测, 主要分为两类: 非标记型和标记型.

(1) 非标记型核酸适配体传感器. 非标记型传感器不需要通过对用于检测目标物质的核酸适配体等进行特异性标记, 即不需要在原来的探针基础上引入报告基团并利用报告基团的物理、化学特征的改变来进行检测. 其原理是可以是通过检测特异结合前后传感器器件性质的改变(如阻抗型电化学核酸适配体传感器、场效应晶体管核酸适配体传感器)或被捕获目标物质的特征反应(如计时电位溶出型核酸适配体传感器、吸附电活性指示剂型核酸适配体传感器)来实现的. 下面进行详细介绍.

阻抗型(electrochemical impedance spectroscopy, EIS)电化学核酸适配体传感器: 是一种无需加入额外的试剂或标记物的新型电化学生物传感器. 此方法要求被捕获的目标分析物能阻挡或促进电子转移. 通过监测电子转移电阻的变化可以直接灵敏地观察固定核

酸适配体与目标分析物之间的识别过程. 此类型传感器常用 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 探针来监测这一识别过程, 也称为法拉第阻抗谱(faraday impedance spectroscopy, FIS). 该方法已被用于溶菌酶、IgE和凝血酶等物质的检测上, 并且有Radi等人^[7]的研究发现用2.0 mol/L的NaCl处理后, 检测IgE的核酸适配体表面能够再生, 进行再次测量. 随后, Fang研究组^[8]发现一种放大电阻信号的方法, 检测限达到 1.0×10^{-14} mol/L.

计时电位溶出型(chronopotentiometric stripping analysis, CPSA)核酸适配体传感器. 电位溶出分析法是一种把电解富集和溶出测定结合在一起的电化学分析方法. 电位溶出法的操作分两步: 第一步是在恒电位下进行电解富集; 第二步是被富集的元素利用化学反应溶出, 记录电位随时间变化曲线. 应用到核酸适配体传感器上, 利用蛋白质固有的电活性来直接检测蛋白质. 因此, 该检测方法主要用于蛋白质的检测上. Wang研究组^[9]首次将核酸适配体修饰的磁珠与CPSA相结合, 构建了免标记化学法检测溶菌酶, 其检测下限可达7 nmol/L.

场效应晶体管型(field effect transistor, FET)核酸适配体传感器: 该检测方法的原理是, 在源极和漏极之间的通道固定传感元件与核酸适配体, 由于核酸适配体与目标结合前后电荷的改变从而使得场效应器件的漏电流发生改变, 通过检测该变化即可以检测结合过程, 检测目标分子的量. 为检测源-漏电流的变化, 固定化传感层的厚度一般都要比Debye距离小. 否则识别后带电荷的蛋白被相反电荷的离子所屏蔽, 无法检测到信号^[10]. 王平研究组^[11]利用经过二氧化钛处理的光寻址电位传感器(light-addressable potentiometric sensor, LAPS), 基于场效应器件的特性, 构建了一个能够利用核酸适配体测量特定无标记DNA序列的核酸适配体传感器.

吸附电活性指示剂型核酸适配体传感器: 该类核酸适配体传感器是利用能够与目标分子结合的一些电活性指示剂来对适配体与目标分子结合的程度进行测量. Hianik等人^[12]利用亚甲基蓝(methylene blue, MB)来构建核酸适配体传感器就是这方面的例子. 由于MB分子可以很容易吸附到凝血酶上, 所以通过MB分子的电信号响应就可以测量出结合到适配体上的凝血酶的量, 从而实现检测, 其检测限为10 nmol/L.

(2) 标记型核酸适配体传感器. 与非标记型核酸适

配体传感器不同, 标记型核酸适配体传感器需要在检测探针上标记报告基团, 通过检测适配体与目标物质结合前后报告基团的改变量来实现对目标物质的特异性检测。

夹心型核酸适配体传感器. 夹心法广泛应用于免疫分析中. 该方法的原理是采用捕获和检测两个探针, 对目标物质进行检测. 捕获探针用于把目标物质捕获并固定于传感器表面, 检测探针通过标记报告基团向外输出信号实现监测. 其报告基团可以多种多样, 如酶、纳米分子等. Katakis研究组^[13]利用辣根过氧化物酶标记的核酸适配体发展了用于凝血酶检测的夹心型适配体电化学传感器, 其检测限达到80 nmol/L. 该检测方法要求目标物质存在多个结合位点可以和不同的特异性核酸适配体结合, 所以对检测对象的要求比较高, 适用范围较窄, 仅适用于某些蛋白质(如凝血酶)的检测。

量子点(quantum dots, QD)标记竞争型核酸适配体传感器. 量子点是准零维的纳米材料, 由少量的原子所构成, 具有十分特殊的光学、电学及非线性光学性质^[14], 在太阳能电池、发光器件、光学生物标记等领域具有广泛的应用前景. 将其与电化学溶出检测(strip-ping detection)结合, 已被证实是一种有效的用于蛋白质检测的生物分析方法. Wang研究组^[15]设计了竞争型多分析物电化学核酸适配体传感器用于凝血酶和溶菌酶的同时检测, 其基本原理如图2所示, 检测结果表明该传感器表现出很好的特异性及灵敏性。

1.2 构型变换型核酸适配体生物传感器

核酸适配体与配体结合时, 通常会通过构型适配形成一些稳定的二级结构, 如发卡(hairpin)、茎-环(stem-loop)、G-四聚体(G-tetramer)、假节(pseudo-knot)、鼓包(bulge)等^[16]. 首先, 在适配体上引入报告基团, 由于适配体与目标分子结合前后报告基团与传感器表面的距离发生变化, 通过检测该变化造成的检测信号的变化就能检测出目标物质的量. 这种传感器可分为信号增强型(signal-on)或信号减弱型(signal-off). 信号减弱型的特点是输出信号随着检测目标物质浓度的增加而减弱, 具有一定的局限性. 因为其信号的增益是受到限制的, 最多只有100%的信号被衰减. 并且, 污染物以及其他物质所产生的“假信号”与特异靶物质的结合所产生的信号很难区别. 而信号增强型传感器, 即

输出信号随浓度的增加而增加的传感器, 则能够很好地克服信号减弱型的不足, 得到广泛的应用。

(1) 分子内构型变换型核酸适配体生物传感器. 该类型的传感器中核酸适配体一端被固定在传感器表面上, 而另一端则标记上报告基团. 在特异结合前后, 适配体单链的构型发生改变, 使得报告基团靠近或远离传感器表面, 导致电信号输出的改变. 而引起电信号改变的机制并不相同。

Plaxco研究组^[17]设计了一种免标记信号减弱型电化学适配体传感器用于检测血清中的凝血酶. 在结合前, 适配体保持非折叠构型, 使信标分子碰撞电极表面并转移电子. 加入凝血酶后, 信标适配体折叠成G-四联体结构以利于凝血酶-适配体间发生适应性结合作用. 由于靶物质的结合引起标记物与电极距离增加, 所以电子转移受到抑制。

Wei等人^[18]则利用发夹分子构型的适配体改变与之偶联的辣根过氧化物酶催化的氧化还原反应实现了唾液中低拷贝数RNA分子的高灵敏度检测. 该传感器的工作原理如图3所示, 在与目标RNA结合前, 适配体分子形成发夹结构使得报告基团贴近传感器表面, 形成比较强的空间位阻. 在与目标RNA分子特异性结合后, 发夹结构被打开, 报告基团远离表面使得其能够与辣根过氧化物酶络合从而催化氧化还原反应并输出电流. 电流的强度与目标RNA的浓度成正比. 该传感器是一个信号增强型传感器。

(2) 目标诱导链置换型核酸适配体生物传感器. 该类传感器与分子内构型变换型核酸适配体生物传感器的不同之处在于, 适配体特异结合前, 适配体与其互补的核酸链形成刚性双链结构固定在传感器表面; 当加入目标物质之后, 会与互补双链中的一条单链结合, 使得其刚性结构破坏, 核酸适配体重新形成新的构型, 使得其报告基团靠近或远离传感器表面, 造成器件输出的电信号发生改变. Wei等人^[18]设计了检测三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)的电化学适配体传感器. ATP的加入使得刚性双链结构破坏, 适配体与ATP特异结合后形成新的构型, 使得报告基团靠近了电极表面, 形成可以测量的电流。

1.3 其他核酸适配体生物传感器

利用核酸适配体与配体特异结合构造的传感器还有酶参与型传感器. 该类型的传感器以酶催化反应为

图2 量子点(QD)标记竞争型核酸适配体传感器的工作原理(网络版彩图)^[15]

图3 用于检测唾液中低拷贝数RNA分子的适配体生物传感器的工作原理^[18](网络版彩图)

核心来设计, 其设计方案根据具体酶的特性而定, 所以并没有一套特定的模式, 在此不一一举例, 仅举出两种比较有代表性的设计方案: (i) 通过适配体特异结合影响酶的活性使得后续反应的强度发生变化, 从而可以实现对目标分子的检测; (ii) 通过适配体特异结合在传感器表面引入特定的酶, 通过检测酶催化的化学反应的变化情况, 即可检测到目标物质的相关信息。除了上述设计方案以外, 还有一些其他的类型的利用核酸适配体进行检测的传感器, 如表面临近杂交型传感器等。这些类型的传感器融合了以上提及的两种或几种类型传感器的特点或是完全从一个新的角度来进行设计, 在此不一一详述。

2 适配体在受体生物传感器方面的应用

2.1 嗅觉受体传感器

嗅觉受体是一种表达在嗅上皮嗅觉受体神经元上的G蛋白偶联受体, 可以与特异性的气味分子相结合激活细胞内信号转导通路, 使嗅觉受体神经元产生动作电位, 在气味识别过程中起重要作用。生物嗅觉系统具有高敏感性和很好的特异性, 鉴于此优点, 人们利用来自生物嗅觉系统的功能性受体蛋白作为敏感元件开发了不同的仿生嗅觉受体传感器, 具有广阔的应

用前景。适配体在嗅觉受体传感器中主要是用于固定嗅觉受体蛋白, 提高受体蛋白与器件的耦合效率, 进而提高传感器的检测性能。

Du等人^[19]研究了具有高敏感性和特异性的基于嗅觉受体的压电生物传感器, 用于气味检测。在此研究中, 适配体作为敏感元件和传感器之间耦合的桥梁, 被用于固定特异性的嗅觉受体蛋白, 实现受体蛋白与石英晶体微天平金电极表面的特异性有效耦合, 以提高生物传感器的特异性和敏感性。该传感器的原理及检测系统如图4所示。首先, 将嗅觉受体ODR-10表达在HEK-293细胞膜上, 同时受体的N末端融合表达了His₆标签。再将HEK-293细胞的质膜提取出来, 其中包含了带有His₆标签的ODR-10, 作为气味分子检测的敏感元件。抗His₆标签的适配体共价固定在石英晶体微天平电极的金表面, 以特异性捕获His₆标记的ODR-10, 同时实现ODR-10的纯化, 从而提高耦合效率。检测结果显示, 与传统的固定方法相比, 采用适配体辅助固定法制备的受体传感器具有更高的特异性和灵敏度, 检测限低至 1.5×10^{-6} (v/v)。

2.2 味觉受体传感器

味觉传感器是一种基于味觉受体蛋白或者细胞的生物传感器, 用于检测特异性味觉物质。该传感器利用

图 4 压电嗅觉受体生物传感器及其测量系统(网络版彩图)^[19]

插图示意了适配体辅助的ODR-10固定机制

生物味觉系统的功能性部件作为敏感材料, 通过使用诸如石英晶体微天平、光寻址电位传感器等传感芯片作为二级换能器, 用于记录味觉受体或细胞对特异性味觉物质的响应信号. 例如, 在细胞水平上, 目前已经在传感芯片表面培养来自味蕾的多种细胞, 可同时检测在不同味觉物质刺激下细胞的电位响应信号; 在分子水平上, 可以利用异源表达的味觉受体蛋白与二级换能器相耦合, 通过检测受体与配体的相互作用时间对味觉信号检测. 吴春生等人^[20,21]利用适配体作为敏感元件, 光寻址电位传感器作为二级传感器, 构建了一种可以检测单个味蕾细胞释放的ATP, 用于研究味蕾细胞间通信的机制. 基于适配体的ATP敏感性的生物传感器的检测机制如图5所示. 通过硅烷化作用在LAPS芯片表面共价固定对ATP敏感的适配体, 在芯片表面培养大鼠(*Rattus norvegicus*)味蕾细胞, 基于LAPS的光寻址功能, 对单个味蕾细胞在不同味觉刺激下的ATP释放进行检测, 以研究ATP在味蕾细胞通信过程中发挥的作用和机制. 结果显示, 该传感器可以检测到单个味蕾细胞在受到苦、甜、鲜刺激时释放的细胞外ATP, 具有很高的灵敏度和特异性. 该传感器具有很大的潜力作为一种新的ATP检测工具应用于味蕾

细胞间通信的研究.

Wu等人^[22]使用具有自组装特性的适配体将苦味受体蛋白固定在石英晶体微天平器件的金电极表面, 构建了一种可以检测特异性苦味物质的仿生味觉受体传感器. 该传感器的组成结构如图6所示, 首先在石英晶体微天平器件的一个抛光金电极的表面通过自组装的方法固定一层巯基修饰的能与His₆标签特异性结合的适配体; 再将带有His₆标签的苦味受体蛋白通过与适配体的特异性识别和结合作用固定在金电极表面; 最终通过检测电极表面的质量变化来反映受体与配体特异性的相互作用. 适配体在该传感器中不仅发挥了固定苦味受体蛋白的作用, 而且由于适配体有特异性识别His₆标签的功能, 可以起到一定的纯化功能, 进而提高传感器的检测性能. 结果表明, 采用适配体自组装技术构建的传感器与采用传统自组装技术的传感器相比, 其检测灵敏度可以提高2倍, 达到 1.21 kHz/mM.

3 适配体传感器在检测小分子物质方面的应用

小分子物质的检测和分析在生物医学中具有极其

图5 基于适配体的ATP敏感性的生物传感器的检测机制示意图(网络版彩图)^[21]

图6 基于自组装适配体的仿生味觉受体传感器的组成结构(网络版彩图)^[22]

重要的意义,其需求也越来越大、应用越来越广泛。随着现代工业化进程的加快,重金属污染问题已经对生态环境、农业可持续发展等构成了严重的威胁,尤其对食品安全的影响日益加剧。重金属污染的威胁在于可以在生物体内富集,转变成毒性更大的金属-有机化合物,对人体健康、土壤环境产生更大的危害。近些年虽发展了诸如酶分析法、免疫分析法、试纸法等快速检测方法,但传统的检测方法相比,大部分快速检测方法只能对被检物定性(或半定量)检测,灵敏度和准确性低于传统检测方法。因此,更多的研究转向了同时具有简便、快速、成本低、灵敏度和准确性高等特点的新型的基于适配体检测方法的开发^[23~26]。

梁顺超等人^[27]将一端富T碱基的发卡DNA适配体与 Ru(phen)_3^{2+} 相结合,使 Ru(phen)_3^{2+} 嵌入双螺旋结构中,形成探针DNA,用富A碱基的DNA链与之碱基互补配对以防止加入 Hg^{2+} 后探针相互结合,然后金电极表面修饰的富T的单链DNA适配体与探针通过 Hg^{2+} 结合,电极在外加电位作用下发光,发光强度与 Hg^{2+} 浓度

成正比,该传感器的检出限达 0.02 nmol/L 。

赵秋伶等人^[28]基于富含胸腺嘧啶的DNA适配体对 Hg^{2+} 的特异性识别和核酸外切酶I (*Exo I*)辅助的信号转换策略,建立了快速检测人尿液中 Hg^{2+} 的适配体生物传感器。固定在微孔板上的DNA适配体特异识别 Hg^{2+} 后,折叠成稳定的发卡型双链结构,不能被单链特异性的*Exo I*水解,核酸染料 SYBR GreenI (SG)插入发卡部位产生荧光信号,基于此可实现 Hg^{2+} 的定量检测。优化后的最佳实验条件为:微孔板包被亲和素浓度为 50 mg/L ;检测DNA包被浓度为 75 nmol/L ;使用 $5 \times \text{SG}$ 以及 $1.2 \mu\text{L}$ 的*Exo I*。在最佳实验条件下,体系荧光强度与 Hg^{2+} 浓度的对数呈良好线性关系,线性范围为 $2 \sim 500 \text{ nmol/L}$,检出限为 1.5 nmol/L 。利用本方法检测尿样中的 Hg^{2+} ,加标回收率为 $91.2\% \sim 95.0\%$,相对标准偏差($n=5$)为 $2.1\% \sim 4.6\%$ 。本方法具有选择性好、操作简单等优点,用 $\text{HNO}_3\text{-KMnO}_4$ 溶液将尿液中其他形式的汞氧化为 Hg^{2+} 后,成功实现了尿液中总汞含量的检测。

4 适配体生物传感器在检测蛋白质方面的应用

4.1 适配体生物传感器检测肿瘤标志物

肿瘤标志物(tumor markers, TM)是指存于恶性肿瘤细胞或恶性肿瘤细胞异常产生的物质或是宿主对肿瘤反应而产生的物质。这些物质存在于肿瘤细胞和组织中,也可进入血液和其他体液,当肿瘤发生、发展时,这些物质明显异常。因此通过对特定肿瘤标志物的检测可建立一种无损的和有针对性的检测方案,让早期癌症的检测成为可能,从而能够提高癌症治疗的效果。适配体以其高特异性、高亲和力、可修饰、易于制备等特点,得到了研究者的日益重视。随着适配体筛选技术研究水平的进一步提高,以及与生物芯片、纳米技术、生物传感器、分子信标等技术的相结合发展,适配体技术可以快速、灵敏、特异、自动化地进行肿瘤标志物的筛选,这必将大大促进肿瘤的筛查和早期诊断,为早期发现并治愈肿瘤提供可能^[29~33]。

Li等人^[34]构建了一种结合了具有靶向识别特性的适配体和具有荧光特性的适配体官能化的银纳米团簇(AgNCs)的新型探针,用于检测乳腺癌标志物MUC1黏蛋白。该MUC1适配体,能够特异性地与MUC1黏蛋白

结合. 他们首先设计了能够用于形成AgNCs的DNA模板. 该模板包含3部分: (i) 一个富含胞嘧啶的序列, C4A4C3链, 可用于嵌合荧光AgNCs; (ii) 通常由poly A或T组成的接头; (iii) 识别MUC1黏蛋白的序列. 在他们的研究中, C4A4C3序列通过-AAAAA-接头与MUC1适配体结合. 然后银离子与C4A4C3序列结合并还原为银簇AgNCs. 此时的整个DNA模板都带有一段红色荧光. 当其与MCF-7乳腺癌细胞孵育后, 带有银簇AgNCs的MUC1适配体与MUC1黏蛋白结合, 从而MCF-7乳腺癌细胞发出红色荧光(E_x/E_m 为560/605 nm), 高量子产率为66.5%, 用此方法可特异性地诊断MCF-7乳腺癌.

Yan等人^[35]报道了基于i-基序驱动构象改变的用于靶向癌症成像的pH响应性可激活适体探针. 该可激活的适配体探针包含两个单链DNA. (i) 27聚体单链寡核苷酸 I, 其含有4个胞嘧啶(C)富集区段, 3'末端用黑洞猝灭剂2 (BHQ2)标记. (ii) 35聚体DNA链A, 由在3'末端(绿色)的中央目标特异性适体序列和5'末端(红色)的延伸序列组成. 链A的延伸序列与链 I 部分互补. 链A的5'端标记有荧光团(TAMRA). 在中性或微碱性pH下, 链 I 与链A的延伸序列杂交至形成称为基于i-基序的可激活适体探针(I-AAP)的双链DNA探针. 链A的5'末端的TAMRA保持在链 I 的3'末端的BHQ2附近. 此时, I-AAP探针处于“信号断开”状态. 然而, 在微酸性pH条件下, 链 I 的富含C链的结构域可以通过半质子化胞嘧啶-胞嘧啶(C·C+)碱基对形成折叠成分子内i-基序, 导致双链的去杂交以及荧光团与猝灭剂的更大距离. 于是, 链A的荧光信号被激活, 并且活化链A针对靶癌细胞的存在进行靶向成像. 为了证明这一原理, MCF-7细胞的成像通过使用特定的适配体AS1411进行.

4.2 适配体生物传感器检测凝血酶

凝血酶是一种重要的蛋白酶, 在血液凝固、炎症和创伤愈合等生理及病理过程中发挥重要作用, 因此检测凝血酶在医学上具有重要意义. 凝血酶(thrombin)的浓度及活性是衡量凝血机制的重要指标, 对揭示疾病的发生机制以及早期诊断、分子分型、疗效及预后判断等具有重要意义^[36].

Degefa等人^[37]基于酶催化银沉积的原理开发了适配体电化学传感器用于检测凝血酶. 该传感器检测的

靶蛋白-凝血酶, 首先被金属电极表面自组装单层的硫醇化适配体捕获, 然后加入另一个生物素化的凝血酶结合的适配体用于附着甲基化的碱性磷酸酶(avidinylated alkaline phosphatase, Av-ALP). 附着的Av-ALP将非电活性基质对氨基苯基磷酸(P-aminophenyl phosphoric acid, P-App)酶促转化为对氨基苯酚(P-aminophenol, P-Ap), P-Ap可以降低溶液中的银离子, 导致金属银沉积在电极表面. 最后用线性扫描伏安法(linear sweep voltammetry, LSV)检测沉积的银的量. 结果表明, 阳极扫描期间的峰值电流可以反映捕获到夹心构型的靶蛋白的量. 该方法已成功用于检测0.1 nmol~1 μ m范围的凝血酶.

Wang等人^[38]研究了使用具有适配体-靶分子-适配体三明治结构和荧光二氧化硅纳米探针的磁性纳米平台进行凝血酶的荧光检测. 与单染分子相比, 掺杂二氧化硅纳米粒子的RuBpy具有高度的光稳定性, 并能提供显著的荧光信号放大. TAB1是结合凝血酶(纤维蛋白原结合位点)的外位点 I 的15聚体DNA适配体, 而TAB2是结合凝血酶(肝素蛋白原结合位点)的外位点 II 的29聚体DNA适配体. 在该研究中, 15聚体凝血酶结合适配体(15-A)被固定在掺杂二氧化硅纳米颗粒的包裹钉联吡啶(RuBpy)表面上, 29聚体凝血酶结合适配体(29-A)被固定在磁珠的表面, 并且在用两种适配体修饰的颗粒添加靶凝血酶分子时形成三明治适配体复合物. 因此, 通过在靶标磁珠分离后检测复合物的荧光强度来进行凝血酶的定量分析. 结果显示, 该传感器对凝血酶的检测限达到0.70 nmol/L.

贵莉莉^[39]设计了一种简单、通用的基于核酸适配体免标记的高敏感、高专一检测凝血酶的荧光方法. 核酸适配体荧光法检测凝血酶的原理如图7所示. 以免标记凝血酶核酸适配体单链DNA为识别元件, PicoGreen染料传导互补双链的荧光信号. PicoGreen是一种不对称菁, 单独存在时不产生荧光信号, 当其被吸附到互补的双链DNA上时, 可产生很强的荧光信号, 但被吸附到单链DNA上时, 却无明显的信号改变. 基于该性质, 将其用于凝血酶的检测. 结果表明, 该传感器对凝血酶的响应线性范围为 $1.0 \times 1.0^{-14} \sim 1.0 \times 10^{-7}$ mol/L, 相关系数(r^2)为 0.99, 检出限为 1.0×10^{-14} mol/L. 1.0×10^{-8} mol/L的两种干扰物质(牛血清蛋白和细胞色素C)的存在不影响凝血酶的检测, 表明该方法对凝血酶具有非常好的专一性. 该方法成

图7 基于带有银簇AgNCs的MUC1适配体检测MCF-7乳腺癌细胞的原理示意图(网络版彩图)^[34]

图8 核酸适配体荧光法检测凝血酶的原理示意图(网络版彩图)^[39]

功应用于对人血清样品的检测, 其平均回收率为97%~102%。该方法可简单、灵敏、特异性地检测凝血酶, 有望用于医学临床诊断等领域。

4.3 适配体传感器检测溶菌酶

溶菌酶是一种专门作用于微生物细胞壁的水解酶, 又称为细胞壁溶解酶或N-乙酰胞壁质聚糖水解酶, 能选择性地分解微生物的细胞壁而具有杀菌、抗病毒、抗肿瘤细胞等功能, 广泛应用于食品、医药等领域。溶菌酶广泛存在于自然界中, 主要存在于多种有机体中诸如细菌、噬菌体、真菌、植物和动物体中。研究表明, 冠心病患者体内溶菌酶的水平与其代谢综合征相关, 尿液和血清中溶菌酶的增加会导致白血病、肾脏疾病和脑膜炎等。因此, 溶菌酶已被广泛应用于生物工程和医疗领域^[40-46]。

Mishra等人^[47]研究了基于超顺磁纳米珠的新型比色竞争适配体法测定溶菌酶。溶菌酶常存在于酒中, 众所周知, 溶菌酶能够对人的身体产生毒性。因此, 如果能够高效又可靠地检测出存在于酒中的溶菌酶的话, 那将是对人类健康的一大贡献。在该研究中, 用羧化的磁珠作为支架来固定靶分子Lys, 开发了基于竞争性适配体的方法来检测Lys。使用的适配体序列被生物素

化, 然后进一步与微孔中的链酶亲和素-碱性磷酸酶(Stp-ALP)结合, 为了优化不同实验适配体, 作了比色测定。Lys测定结果表明, 在5~140 nmol/L范围内有良好的线性关系, 检测限达到10 nmol/L。中点值(IC₅₀) 10 nmol/L, 分析测定时间为60 min, Lys回收率在99.00%~99.27%。这些结果表明, 该适配体传感器具有作为常规使用的检测工具的应用前景。

Yao等人^[48]研究了基于由聚二烯丙基二甲基氯化铵(PDDA)和LZ-特异性25-碱适配体诱导的金纳米颗粒(AuNP)的聚集比色法用于溶菌酶测定。该方法基于AuNP在加入PDDA时会发生聚集的效应。如果存在适配体, 适配体将与PDDA的静电相互作用以形成双链体结构。因此, AuNP的聚集被抑制。在添加溶菌酶时, 适配体将结合溶菌酶以形成复合物。随后添加PDDA引起20 nm AuNP的聚集, 伴随着溶液从红色到蓝色的颜色变化。基于该颜色变化, 可以用肉眼定性地检测溶菌酶, 进一步通过测量590和531 nm处的吸光值比可以实现基于光度测定的定量检测溶菌酶。在4.4~200 nmol L⁻¹溶菌酶浓度范围内, 响应曲线是线性的, 检测限为4.4 nmol L⁻¹ (S/N=3)。该方法成功用于测定蛋清中的溶菌酶。将检测结果与其他方法进行比较, 回收率在95.8%~115%, RSD<3.9%。

5 结论

适配体在生物传感器方面具有良好的应用前景, 它将作为传统抗体的替代物, 在小分子物质、蛋白质检测、仿生传感器等方面具有重要应用价值, 在生物医学、临床诊断等领域发挥广泛应用。目前, 研究人员已经构建出各种利用核酸适配体构建的传感器, 并对各个学科的研究取得了突破性的影响。利用核酸适配体构建的生物传感器的优势已经得到了初步的体现, 并一定能够成为日后生物传感器发展的热点。但是, 适配体生物传感器的研究还处于起步阶段, 同时随着对检测物质的分析要求的提高, 还有许多关键的问题要通过实验的探索来寻求突破, 其中包括: 进行基础性研究, 结合生物化学和分子力学等知识研究对特定目标物质构建核酸适配体检测方式的一般方法, 提高效率; 发展新的检测原理和分析方法, 构建稳定性高、重现性好、操作便捷的通用型新方法; 不断拓展核酸适配体检测的目标分子的类型, 扩大核酸适配体检测的适用范围。

围. 此外, 提高适配体的特异性、敏感性以及优化适配体的固定、使适配体传感器的检测和分析更灵敏、快速、稳定, 并使其应用实现现场化、商业化将是今后的研究热点.

参考文献

- 1 祝文琪, 高磊, 王晶, 等. 适配体传感器的研究进展. 中国兽药杂志, 2011, 45: 35–40
- 2 左明艳. 基于SELEX技术筛选白蛋白的核酸适配体及磁珠适配体传感器检测细菌内毒素的应用. 硕士学位论文. 合肥: 中国科学技术大学, 2014
- 3 Song S, Wang L, Li J, et al. Aptamer-based biosensors. *TrAC Trends Anal Chem*, 2008, 27: 108–117
- 4 王一娴, 叶尊忠, 斯城燕, 等. 适配体生物传感器在病原微生物检测中的应用. 分析化学, 2012, 40: 634–642
- 5 周玲, 王明华, 王剑平, 等. 传感器表面的适配体固定方法及其在生物传感器中的研究进展. 分析化学, 2011, 39: 432–438
- 6 Seok K Y, Ahmad Raston N H, Bock G M. Aptamer-based nanobiosensors. *Biosens Bioelectron*, 2016, 76: 2–19
- 7 Radi A E, Acero Sánchez J L, Baldrich E, et al. Reusable impedimetric aptasensor. *Anal Chem*, 2005, 77: 6320–6323
- 8 Xu Y, Yang L, Ye X, et al. An aptamer-based protein biosensor by detecting the amplified impedance signal. *Electroanalysis*, 2006, 18: 1449–1456
- 9 Kawde A N, Rodriguez M C, Lee T M H, et al. Label-free bioelectronic detection of aptamer-protein interactions. *Electrochem Commun*, 2005, 7: 537–540
- 10 Matsuo T, Wise K D. An integrated field-effect electrode for biopotential recording. *IEEE Trans*, 1974, 21: 485–487
- 11 Zong X L, Wu C S, Wu X L, et al. A non-labeled DNA biosensor based on light addressable potentiometric sensor modified with TiO₂ thin film. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2009, 10: 860
- 12 Hianik T, Ostatná V, Zajacová Z, et al. Detection of aptamer-protein interactions using QCM and electrochemical indicator methods. *Bioorgan Med Chem Lett*, 2005, 15: 291–295
- 13 Mir M, Vreeke M, Katakis I. Different strategies to develop an electrochemical thrombin aptasensor. *Electrochem Commun*, 2006, 8: 505–511
- 14 李婷. 纳米CdS及其量子点的制备和性能研究. 硕士学位论文. 天津: 天津大学, 2007
- 15 Hansen J A, Wang J, Kawde A N, et al. Quantum-dot/aptamer-based ultrasensitive multi-analyte electrochemical biosensor. *J Am Chem Soc*, 2006, 128: 2228–2229
- 16 刘晓静, 刘韧, 顾长国, 等. 核酸适配体的研究进展. 生理科学进展, 2004, 35: 374–378
- 17 Xiao Y, Lubin A A, Heeger A J, et al. Label-free electronic detection of thrombin in blood serum by using an aptamer-based sensor. *Angew Chem Int Ed*, 2005, 44: 5456–5459
- 18 Wei F, Wang J, Liao W, et al. Electrochemical detection of low-copy number salivary RNA based on specific signal amplification with a hairpin probe. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36: e65
- 19 Du L, Wu C, Peng H, et al. Piezoelectric olfactory receptor biosensor prepared by aptamer-assisted immobilization. *Sensors Actuat B Chem*, 2013, 187: 481–487
- 20 吴春生, 杜立萍, 邹玲, 等. 基于适配体分子传感器的味蕾细胞间通信ATP检测的研究. 全国敏感元件与传感器学术会议, 2014
- 21 Wu C, Du L, Zou L, et al. An ATP sensitive light addressable biosensor for extracellular monitoring of single taste receptor cell. *Biomed Microdev*, 2012, 14: 1047–1053
- 22 Wu C, Du L, Zou L, et al. A biomimetic bitter receptor-based biosensor with high efficiency immobilization and purification using self-assembled aptamers. *Analyst*, 2013, 138: 5989–5994
- 23 于寒松, 隋佳辰, 代佳宇, 等. 核酸适配体技术在食品重金属检测中的应用研究进展. 食品科学, 2015, 36: 228–233
- 24 詹深山, 吴远根, 邱树毅, 等. 基于纳米金和核酸适配体的重金属离子传感器研究进展. 上海交通大学学报(农业科学版), 2012, 30: 1–7
- 25 Mckeague M, Derosa M C. Challenges and opportunities for small molecule aptamer development. *J Nucleic Acids*, 2012, 2012: 748913
- 26 Pfeiffer F, Mayer G. Selection and biosensor application of aptamers for small molecules. *Front Chem*, 2016, 4: 25
- 27 梁顺超, 魏小平, 黄文刚, 等. 适配体电化学传感器检测汞离子进展. 分析测试学报, 2016, 35: 618–626
- 28 赵秋玲, 张尤华, 于晓艳. 基于核酸外切酶 I 的适配体荧光传感器检测人尿液中的Hg²⁺. 分析化学, 2016, 44: 1099–1105
- 29 李慧, 王鸣刚, 刘巍. 适配体技术及其在肿瘤标志物检测中的应用. 甘肃科技, 2009, 25: 156–158

- 30 徐雯, 薛婷, 余娟, 等. 一种基于适配体的快速检测宫颈癌标志物P16INK4A的方法. 华中科技大学学报(医学版), 2015, (6): 667–673
- 31 Cheng A K H, Su H, Wang Y A, et al. Aptamer-based detection of epithelial tumor marker mucin 1 with quantum dot-based fluorescence readout. *Anal Chem*, 2009, 81: 6130–6139
- 32 Li H, Bai X, Wang N, et al. Aptamer-based microcantilever biosensor for ultrasensitive detection of tumor marker nucleolin. *Talanta*, 2015, 146: 727–731
- 33 Lin M Y, Lu Y P, Grumezescu A, et al. Tumor marker detection by aptamer-functionalized graphene oxide. *Curr Organic Chemist*, 2013, 17: 132–136
- 34 Li T, Yang J, Ali Z, et al. Synthesis of aptamer-functionalized Ag nanoclusters for MCF-7 breast cancer cells imaging. *Sci China Chem*, 2017, 60: 370–376
- 35 Yan L, Shi H, He D, et al. A pH-responsive activatable aptamer probe for targeted cancer imaging based on i-motif-driven conformation alteration. *Sci China Chem*, 2016, 59: 802–808
- 36 徒永华, 程圭芳, 林莉, 等. 基于核酸适配体的新型荧光纳米生物传感器用于凝血酶的测定. 高等学校化学学报, 2006, 27: 2266–2270
- 37 Degefa T H, Hwang S, Kwon D, et al. Aptamer-based electrochemical detection of protein using enzymatic silver deposition. *Electrochim Acta*, 2009, 54: 6788–6791
- 38 Wang W, Xu D D, Pang D W, et al. Fluorescent sensing of thrombin using a magnetic nano-platform with aptamer-target-aptamer sandwich and fluorescent silica nanoprobe. *J Lumin*, 2017, 187: 9–13
- 39 贵莉莉. 基于无标记的核酸适配体荧光生物传感器检测凝血酶. 分析测试学报, 2016, 35: 1054–1057
- 40 赵瑞芳, 冯锋, 双少敏, 等. 基于金纳米和适配体的表面等离子体共振技术检测溶菌酶. 山西大同大学学报(自然科学版), 2013, 29: 34–36
- 41 Ocaña C, Hayat A, Mishra R, et al. A novel electrochemical aptamer-antibody sandwich assay for lysozyme detection. *Analyst*, 2015, 140: 4148–4153
- 42 Erdem A, Eksin E, Muti M. Chitosan-graphene oxide based aptasensor for the impedimetric detection of lysozyme. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 2014, 115: 205–211
- 43 Lu L, Wang W, Wang M, et al. A luminescent G-quadruplex-selective iridium(III) complex for the label-free detection of lysozyme. *J Mater Chem B*, 2016, 4: 2407–2411
- 44 Mihai I, Vezeanu A, Polonschii C, et al. Label-free detection of lysozyme in wines using an aptamer based biosensor and SPR detection. *Sensors Actuat B Chemical*, 2015, 206: 198–204
- 45 Rodríguez M C, Rivas G A. Label-free electrochemical aptasensor for the detection of lysozyme. *Talanta*, 2009, 78: 212–216
- 46 Tran D T, Janssen K P F, Pollet J, et al. Selection and characterization of DNA aptamers for egg white lysozyme. *Molecules*, 2010, 15: 1127–1140
- 47 Mishra R K, Hayat A, Mishra G K, et al. A novel colorimetric competitive aptamer assay for lysozyme detection based on superparamagnetic nanobeads. *Talanta*, 2016, 165: 436–441
- 48 Yao X, Ma X, Ding C, et al. Colorimetric determination of lysozyme based on the aggregation of gold nanoparticles controlled by a cationic polymer and an aptamer. *Microchim Acta*, 2016, 183: 2353–2359

The application of aptamers in receptor- and molecule-based biosensors

CHEN FangMing¹, CHEN Wei¹, WANG Jian¹, DU LiPing¹, WU ChunSheng^{1,2} & WANG Ping²

1 Institute of Medical Engineering, Department of Biophysics, School of Basic Medical Sciences, Health Science Center, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China;

2 Key Laboratory of Biomedical Engineering of Ministry of Education, Biosensor National Special Laboratory, Department of Biomedical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China

Aptamer is an oligonucleotide sequence that can bind to a specific target molecule, which is screened from a random oligonucleotide library. It has shown promising prospects in biomedical applications. Due to its decisive advantages such as simple preparation, easy modification, good stability and wide range of targets compared with traditional antibodies, aptamer has been widely applied in the development of biosensors, which can not only be used to realize the identification and detection of target molecules, but also be utilized as the bridge between sensitive elements and transducers to improve the coupling efficiency. In addition, in recent years, the introduction of various nanomaterials such as metal nanoparticles, carbon materials and functional nanospheres to aptamer-based biosensors has contributed to their improvement in analytical performances and commercial applications. First, this review briefly introduces the methods for aptamer screening based on the SELEX technique and summarizes basic properties of aptamers. Second, the basic principle and classification of aptamer-based biosensors are introduced in detail. Third, based on the most recent progress in the field of aptamer-based biosensors, we focus on the applications of aptamers in biosensor development, including the applications in the field of biomimetic olfactory and taste receptor biosensors as well as applications in the detection of small molecules and proteins. Finally, we analyze and discuss the problems and development trends of applications of aptamers in biosensors.

aptamer, sensitive elements, biosensors, molecular sensors, receptor sensor

doi: [10.1360/N052017-00123](https://engine.scichina.com/doi/10.1360/N052017-00123)