

孔雀石绿适配体生物传感器的研究进展

丰敏¹, 杜宁¹, 张洋子², 李相阳³, 许文涛^{2*}, 刘海燕^{1*}

1.华北理工大学公共卫生学院, 河北 唐山 063210;

2.中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083;

3.北京农学院食品科学与工程学院, 北京 102206

摘要: 荧光适配体作为一种无需标记的荧光探针,具有许多潜在的优势,并被应用于多种靶物质(如 ATP、RNA)的检测,是目前适配体研究领域的热点。孔雀石绿适配体(malachite green aptamer, MGA)属于荧光适配体,其能通过配体诱导折叠形成结合口袋,进而促进孔雀石绿(malachite green, MG)的发光。目前,已经筛选得到的 MGA 的种类较少,主要介绍了已知的 MG RNA 适配体及其变构体和 MG DNA 适配体的特性,以及影响 MG-MGA 复合物荧光强度的因素。同时,还对主要的 MG 衍生物和共聚物进行了总结。最后,综述了 MGA 在生物传感、荧光成像等方面的应用,并对 MGA 的发展方向进行了展望,以期为 MGA 在生物检测、生物成像等方面的应用提供指导。

关键词: 荧光适配体;孔雀石绿适配体;生物传感;荧光成像

DOI:10.19586/j.2095-2341.2019.0095

Progress on Biosensor Based on Malachite Green Aptamer

FENG Min¹, DU Ning¹, ZHANG Yangzi², LI Xiangyang³, XU Wentao^{2*}, LIU Haiyan^{1*}

1.School of Public Health, North China University of Science and Technology, Hebei Tangshan 063210, China;

2.College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;

3.College of Food Science and Engineering, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China

Abstract: As a fluorescent probe without labeling, fluorescent aptamer has many potential advantages and has been applied to detect a variety of target substances (such as ATP, RNA), which is currently a hot spot in the field of aptamer research. Malachite green aptamer (MGA) belongs to fluorescent aptamer, which can form binding pockets through ligand-induced folding, thus promoting the luminescence of malachite green (MG). At present, there are few kinds of MGA that have been screened out. Therefore, the characteristics of known MG RNA aptamers and their allosteric bodies, MG DNA aptamers were mainly introduced, as well as the factors affecting the fluorescence intensity of MG-MGA complexes. At the same time, the main MG derivatives and copolymers were also summarized. Finally, the applications of MGA in biosensing and fluorescence imaging were reviewed, and the development direction of MGA was prospected, so as to provide guidance for the application of MGA in biological detection and bioimaging, etc.

Key words: fluorescent aptamer; malachite green aptamer; biosensing; fluorescence imaging

孔雀石绿(malachite green, MG)又称为苯胺绿、盐基块绿、中国绿、碱基绿,是一种人工合成的三苯甲烷类染料,分子式为 $C_{23}H_{25}N_2Cl$,属于小分子物质^[1-3]。MG 本身的荧光量子产率极低,被认为是一种无荧光物质。但当 MG 与孔雀石绿适配

体(malachite green aptamer, MGA)结合时,荧光强度显著增加^[4]。MG 的结构由 1 个中心碳原子连接的 3 个苯环组成,结构灵活,3 个苯环之间可自由旋转,其中,不含二甲氨基取代基的环(C 环)被认为是影响 MG 发挥作用的核心基团。需要注

收稿日期:2019-09-25; 接受日期:2019-10-22

基金项目:国家自然科学基金项目(31871875)。

联系方式:丰敏 E-mail:981838423@qq.com

* 通信作者 刘海燕 E-mail:freeair772000@163.com;许文涛 E-mail:xuwentao@cau.edu.cn

意的是, MG 的化学官能团三苯甲烷及 N,N-二甲苯胺均为具有毒性的致癌物质。在酵母细胞和人类卵巢细胞中, MG 的限制浓度为 $0.1 \sim 1 \mu\text{mol/L}$ [5]。

适配体可将目标物包封在其结合口袋内, 是一段能与目标物高特异性、高亲和性结合的短链 DNA 或 RNA 片段。适配体具有与抗体相似的识别行为, 但其空间结构与抗体相比更为灵活, 可通过自身结构的变化来调节功能, 其中具有荧光特性的适配体可用作荧光探针。传统的荧光探针需要在核酸上标记荧光基团、淬灭基团, 若淬灭基团未将荧光基团完全淬灭, 会导致荧光背景值较高 [6]。与传统的荧光探针相比, 荧光适配体是一种典型的无需标记的荧光检测探针, 荧光染料能够与相应的适配体结合形成配体络合物, 从而显著增强荧光信号。研究表明, 在适配体的存在下, 荧光染料的荧光强度能增加 3 个数量级 [7]。因此, MGA 作为一种典型的荧光适配体, 具有潜在的应用价值。

本文根据近年来 MGA 的研究成果综述了 MG RNA 适配体及其变构体和 MG DNA 适配体的特性、研究现状, 以及影响 MG-MGA 复合物荧光强度的因素。同时, 还对 MG 的衍生物和共聚物的特性进行了总结。最后, 综述了 MGA 在生物传感、荧光成像等领域的应用, 以期更好地明确 MGA 在生物检测、生物成像等领域的发展方向。

1 MG RNA 适配体

1.1 筛选与表征

MG RNA 适配体的筛选主要依靠指数富集进化技术 (systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX), 即在体外含有随机序列的分子池中选择可与靶物质高亲和性结合的核酸序列, 通过 MG 诱导适配体发生构象变化, MG 被包裹在适配体内, 形成配体络合物, 并不断的对配体络合物进行 PCR 扩增、富集、测序等过程, 最终将单个核酸从文库中筛选出来。1990 年, Ellington 和 Szostak [8] 第一次通过 SELEX 技术体外筛选获得适配体; 1999 年, Grate 和 Wilson [9] 通过 SELEX 技术筛选出 MGA, 这是设计无标签荧光团探针的第一步。研究发现, MG 与其 RNA 适配体结合, 可以使自身的荧光强度增加 2 000

多倍 [7]。

MG RNA 适配体与配体的亲和力可以通过等温滴定量热法 (isothermal titration calorimetry, ITC)、核磁共振 (nuclear magnetic resonance, NMR) 光谱 [10]、荧光滴定法、平衡透析法和 X-射线晶体学 [11] 等方式进行表征, 其中常用的表征方式为 ITC、NMR 光谱、荧光滴定法。ITC 是一种通过添加不同的结合成分而导致热力学变化的技术, 即通过添加 MGA 产生 MG-MGA 复合物, 从而引起热力学参数结合常数 (K_a)、焓变 (ΔH)、熵变 (ΔS) 发生变化。MG RNA 适配体自适应结合的一个显著特点是未结合配体的适配体口袋中不含可检测结构, 因此可以通过 NMR 光谱测定适配体结合口袋中的碱基配对模式, 通过比较碱基配对的模式来判断适配体的结合情况 [12]。荧光滴定法是通过向 MG 溶液中加入 MGA, 再通过检测 MGA 加入后的荧光变化来实现对于 MGA 的结合常数的表征。

1.2 性质

MG RNA 适配体是一段含有 38 个碱基的核苷酸序列, 它有 2 种密切相关的配体: MG 和 TMR (tetramethylrhodamine)。TMR 是一种常规的线粒体荧光染料, 它可在 MG 的 2 个含有二甲氨基的苯环中间插入醚键, 从而使 MG 结构的刚性增强 [13]。MG RNA 适配体依赖于堆积和静电相互作用与配体识别, 再通过配体诱导、适配体自适应的方式与 MG 结合。RNA 适配体与配体的结合部位是 RNA 适配体的结合口袋, 结合口袋与配体的结合主要是通过质子的驱动发挥作用 [14]。MG RNA 适配体的结合口袋由 1 个基本的四重结构 (C7, G24, G29, A31) 和 1 个 Watson-Crick 碱基对 (G8, C28) 组成, 两侧的 A9 与 A30 关闭了口袋的另一侧 [15]。除 1 个 U32 碱基外, 所有的内环核苷酸都参与了结合口袋的形成, 结合口袋碱基的堆积导致两侧形成双螺旋的茎部结构 [11]。而配体的存在使得 RNA 内部碱基互补配对和堆积, 导致 RNA 适配体结合口袋中的电荷分布发生变化 [16]。

1.3 MG RNA 适配体的变构体

MG RNA 适配体的筛选已较为成熟, 被广泛应用于生物传感器中, 但 RNA 适配体合成成本高、不稳定、易被核酸酶降解。因此, 对 MG RNA

适配体进行劈裂、裁剪等对于提高其稳定性具有重要的作用。

1.3.1 MG RNA 劈裂适配体 劈裂适配体是将原适配体劈裂成2个或者多个短片段而形成的核酸探针^[17]。经过劈裂的核酸片段不具有特定的空间构象,因此无特异性背景信号。而当靶物质存在时,靶物质可使劈裂适配体的空间构象发生变化,形成劈裂适配体-靶物质复合物,进而使得荧光强度增加。利用劈裂适配体进行检测,可在提高检测的灵敏度和特异性的同时降低背景信号,此外,部分劈裂适配体经劈裂后长度缩短,降低了合成成本^[18]。

MG RNA 适配体是典型的带有“三通道”的二级结构,在进行劈裂的时候,首先去除适配体的环状结构,然后对茎上的非结合位点部分的互补序列进行裁剪,减少茎区域的碱基数量^[19]。Kolpashchikov 团队^[20]将38 nt的MGA劈裂成2个部分,其中一条链长为10 nt,另一段链长为16 nt,劈裂适配体的碱基数比原适配体碱基数减少了12 nt,同时,劈裂适配体减少了与配体结合中不必要的空间位阻,节约了合成成本。而且,劈裂的核酸适配体与靶标仍然具有高亲和力和高效的识别能力,并降低了与靶标类物的亲和力,提高了特异性检测靶标的能力。

1.3.2 MG RNA 截短适配体 截短适配体是对已经筛选得到的适配体进行裁剪得到的较短的适配体。目前,在研究中得到了一段碱基数为27 nt且与MG的结合能力较强的MG RNA 截短适配体,它的碱基序列为5'-UCCCGACUGGAACAG-GUAACGAAUGGA-3'^[6,21-22]。2009年,Xu和Lu^[6]将MG RNA 截短适配体与ATP的适配体串联,成功实现对于ATP的检测。2019年,Zhao等^[21]利用一种基于MG RNA 截短适配体结合金纳米粒子构建的生物传感器来检测MG,该生物传感器的灵敏度较高,检测限达到1.8 nmol/L。

1.3.3 其他 为了克服RNA适配体易降解的弊端,2019年,Luo等^[23]提出将一种创新的L型MG RNA 适配体应用于MG的检测,L型适配体的结构是普通适配体结构的镜像对称体,研究表明,这种L型适配体对靶物质的识别能力和亲和力与普通适配体类似,但这种适配体的稳定性显著高于普通适配体,其在缓冲液中21 d内不会发生降解,具有较强的抗酶水解的能力。研究人员

将这种L型MG RNA 适配体用于MG的检测,检测限可达到47.7 nmol/L。

1.4 MG-MG RNA 适配体复合物荧光强度的影响因素

影响MG-MGA复合物荧光强度的因素较多,其中pH、阳离子浓度、温度以及有机溶剂对MG-MGA复合物荧光强度的影响是目前研究的重点^[24]。目前,常使用Tris缓冲液与HEPES缓冲液作为MG与其RNA适配体的结合环境。又由于MG RNA 适配体是在HEPES缓冲液中筛选出来的,因此,对于MG-MGA复合物荧光强度的影响因素的研究主要基于HEPES缓冲液^[6,9,24]。

1.4.1 pH 当RNA适配体暴露于碱液时,适配体会被永久降解,因而,碱性条件会使MG-MGA复合物的荧光信号减弱。当pH大于9时,RNA发生变性,适配体结合域的结构被破坏,导致MG-MGA复合物解离,荧光信号减弱;当恢复到最适pH时,荧光仍无法恢复。当pH为5~9时,MG与其RNA适配体的结合有明显的荧光信号;当pH为6.5~7时,荧光信号最佳^[24]。

1.4.2 阳离子 RNA适配体本身带负电,因此,MG与其RNA适配体的结合需要一定的阳离子环境,而结合环境中阳离子的种类及含量对MG-MGA复合物的形成及其荧光特性至关重要。二价阳离子 Mg^{2+} 和一价阳离子 K^+ 、 Na^+ 是各种缓冲液中常见的阳离子,也是对RNA的折叠有显著影响的阳离子。这些阳离子具有封闭的电子层结构,如 K^+ 、 Mg^{2+} 可通过静电力与RNA相互作用;且这2种离子的半径与离子-RNA复合物的形成有着密切关系,一方面离子的半径决定了给定整合位点的空间配位,另一方面离子的半径越小,电荷密度越大,水合能越大^[6,24]。 K^+ 、 Mg^{2+} 的存在被认为是MG-MGA复合物形成的必要条件,如 Mg^{2+} 的浓度在5~10 mmol/L范围内是荧光信号增强与稳定的最佳条件,荧光强度能保持30 min^[24]。研究表明,二价阳离子不存在时,RNA适配体的结合口袋中不存在碱基互补配对,缺乏三级结构。由此可见,二价阳离子对于三级结构的维持极为重要^[16]。而 K^+ 、 Na^+ 在稳定MG-MGA复合物的性能方面作用相当,它们都对复合物的形成至关重要,因此,结合环境中存在 K^+ 或者 Na^+ 是必要的,研究表明, Na^+ 能增加MG-MGA复合物的荧光

强度^[24]。

1.4.3 温度 MG-MGA 复合物的形成和稳定性都受到温度的影响。当 MG 与其 RNA 适配体在 0 ℃ 孵育时,复合物的荧光信号较弱;当孵育温度为 35 ℃ 时,复合物较难形成;当孵育温度调整为 4~8 ℃ 时,荧光强度最大且荧光信号最稳定,但达到荧光强度最大值的时间较长(需要几天的时间),不能满足快速检测的需要。当 MG 与其 RNA 适配体孵育温度为 16~20 ℃ 时,荧光强度在 16 min 时达到最大值,且荧光信号稳定(约维持 1 周)。因此,16~20 ℃ 为 MG 与其 RNA 适配体孵育的最佳温度^[24]。

1.4.4 有机溶剂 有机溶剂对 MG-MGA 复合物的荧光强度有着不同程度的抑制作用,其中含氢键的有机溶剂对荧光强度的抑制作用相对较弱;此外,有机溶剂对 MG-MGA 复合物的荧光信号有一定的稳定作用,且能减少 MG-MGA 复合物 K_d 值的变化^[24-25]。在羟基存在的情况下,羟基通过攻击 MG 的中心碳(C1)将 MG 漂白,而 MG RNA 适配体的存在可抑制漂白作用,这种抑制作用主要是因为 MG RNA 适配体可与 MG 结合形成 MG-MGA 复合物,从而在空间上将羟基排除,使其不能与 MG 的中心碳(C1)结合;当存在 MG RNA 适配体的反义互补寡核苷酸链时,漂白作用可逆转,可以通过 MG RNA 适配体与反义互补链调节位阻,从而控制 MG 的分子反应活性^[26]。而选用纯水做 MG 与其 RNA 适配体的结合缓冲液的溶剂时,MG-MGA 复合物的荧光效果最佳^[24]。

2 MG DNA 适配体

目前,对于 MG DNA 适配体的研究较少,MG 能与部分 DNA(主要为 G-四联体结构)结合增强荧光信号。当 G-四联体作为 MG DNA 适配体时,MG 的 3 个苯环通过末端叠加的方式加在 G-四联体的 2 个外部四分体上,但 G-四联体结构可以与多种小分子染料结合并增强它们的荧光信号,因此,基于 G-四联体与 MG 的复合物构建的生物传感器无法满足高特异性的需求^[27]。

2016 年,Wang 等^[27]通过利用目标诱导 DNA 适配体释放的 SELEX 方法进行扩增、纯化、筛选,得到 1 种仅含有 26 nt 碱基的 MG DNA 适配体。当该适配体遇到 MG 时,它含有的带有 11 个碱基

的结合口袋能将小分子 MG 包裹在内,使 MG 的荧光信号增强几倍到几十倍。该适配体的 K_d 值为 $2.43 \pm 0.39 \mu\text{mol/L}$,这种荧光适配体的激发波长为 617 nm,发射波长为 650 nm。

关于 MG-MG DNA 适配体复合物荧光强度影响因素的研究较少,目前,研究主要集中在 MG 与 G-四联体复合物荧光强度的影响因素。一价阳离子 K^+ 、 Rb^+ 、 NH_4^+ 、 Na^+ 和 Li^+ 可以稳定 G-四联体结构,而经热力学稳定性分析得出,MG 也可以稳定 G-四联体($d[(\text{T}_2\text{AG}_3)_4]$)结构并显示出对 G-四联体的强亲和作用^[28]。通过荧光光谱分析得出,MG 的吸收波长随着 G-四联体浓度的增加逐渐红移、增大,且吸收峰明显增强。在 K^+ 存在的情况下,MG 与 G-四联体的结合能稳定 G-四联体的结构^[29]。2018 年,Li 等^[30]发现, Pb^{2+} 能改变 G-四联体的二级结构,经 Pb^{2+} 稳定的 G-四联体结构呈反平行构象,且 Pb^{2+} 能增加 MG 与 G-四联体复合物的荧光强度。与 MG RNA 适配体相比,DNA 适配体的合成成本低、稳定性好、不易降解,有利于生物传感器的构建,因此将二者的主要特性进行了比较(表 1),便于后续深入研究。

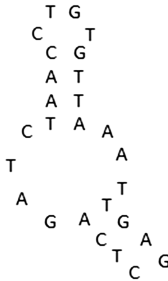
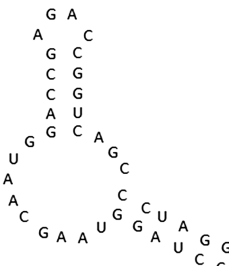
3 MG 的衍生物及共聚物

MG 可通过与 MGA 结合显示出良好的荧光特性,但 MG 具有一定的毒性,在一定程度上影响了 MGA 生物传感器的应用。结晶紫(crystal violet, CV)、TMR、派洛宁 Y(Pyronin Y, PY)等都被证明是 MGA 的结合配体^[12,16],只有了解它们的特性,才能更好地发挥 MGA 的优势。

CV 是 MG 的衍生物,CV 与 MG 结构的区别为 CV 的 3 个苯环上都含有二甲氨基取代基。但 CV 与 G-四联体的复合物荧光微弱,无法区分 G-四联体与其他 DNA,也没有表现出优先与 G-四联体结合的特性^[31]。经荧光光谱分析,CV 的吸收波长不随 G-四联体浓度的增加而变化,且吸收峰的增加缓慢,这主要是由于 CV 的 3 个苯环上都含有二甲氨基取代基,阻碍了 G-四联体中 CV 的插入结合^[29]。

MG、TMR 与 MGA 结合的亲和力高于 CV、PY,但 TMR 无论是单独存在还是与 MG 的 RNA 适配体结合后都能呈现荧光,而 CV 只有在与 MG 的 RNA 适配体结合形成复合物的情况下才能形

表 1 MG DNA 适配体与 MG RNA 适配体的比较
Table 1 Comparison of MG DNA aptamer and MG RNA aptamer

种类	序列(5'→3')	二级结构	长度 /nt	K _d 值 /(μmol/L)	激发波长 /nm	发射波长 /nm	荧光增强 倍数	参考文献
MG DNA 适配体	5'-CTCAGATCTAACC- TTGTTAAATTGAG-3'		26	2.43±0.39	617	650	8.17	[27]
MG RNA 适配体	5'-GGAUCCCGACUGG- CGAGAGCCAGGUAA- CGAAUGGAUCC-3'		38	0.117	630	670	2 360	[7]

成荧光。4 种配体与 MG RNA 适配体的结合速率为 PY>TMR>MG>CV, Mg²⁺ 的加入使得适配体结合配体的速率变慢,但是结合的稳定性增加^[12]。值得一提的是, PY 浓度过高时会产生毒性。当 PY 的浓度为 1.7~3.3 μmol/L 时, PY 主要分布在线粒体中,无细胞毒性,但能抑制细胞的生长,阻碍细胞进入 G1 期;当 PY 的浓度为 6.7~33 μmol/L 时, PY 呈现细胞毒性,分布于细胞核和细胞质中, PY 能诱导 G2 期联体和 S 期细胞停滞^[32]。

此外,孔雀石绿吡啶酰基衍生物(indolyl derivatives, IMG)是在 MG 的结构基础上将 MG 的 A 环与 B 环上的各 1 个甲基分别替换为乙基而形成的衍生物。IMG 的吸收波长为 632 nm, 荧光量子产率约为 MG 的 2 倍;当存在 MGA 时, IMG 的吸收波长红移到 650 nm, 荧光量子产率增加且大于 MG-MGA 复合物的荧光强度^[7]。

聚乙烯醇(poly vinyl alcohol, PVA)与 MG 形成的 MG-聚乙烯醇共聚物(PVAMG)是一种中性的聚合物。研究表明,这种聚合物具有光诱导荧光信号增强的特性,经光照射,这种聚合物含有的带阳离子的芳香环能为平行的 G-四联体结构提供结合位点, MG 可以堆积在 G-四联体的最外层,从而使荧光信号显著增强。而且 PVAMG 与平行

G-四联体结合的亲和力比与非平行 G-四联体结构结合的亲和力强,但在黑暗条件下, PVAMG 与 G-四联体没有亲和力, 荧光信号微弱;无论在黑暗条件下还是在光照条件下, PVAMG 均无细胞毒性^[33]。

4 MGA 的应用

目前, MGA 主要应用于生物检测领域, 利用 MG 与 MGA 结合的高亲和力和荧光特性, 可以实现对于 MG 及其他靶物质的检测。由于 MG 具有一定的毒性, 利用 MGA 实现生物体内的检测及体内荧光成像的研究较少。

4.1 荧光生物传感器

MGA 作为一种性能良好的荧光适配体具有广泛的应用前景, MGA 既可以作为信号识别元件识别靶物质 MG, 又能通过 MG-MGA 复合物的荧光特性实现荧光信号输出。

2010 年, Stead 等^[24]利用固相萃取技术结合 MGA 构建了一种快速检测鱼类组织中 MG 的荧光检测方法。在该研究中, MGA 既作为信号识别元件识别鱼类组织中的 MG, 同时又作为信号输出元件将 MG 与 MGA 的结合信号转化为荧光信

号,从而实现荧光信号的输出。此研究是 MGA 用于食品检测的首次报道,该方法的特异性好,检测周期短,一般在 4 h 内可以完成对 20 个样品的检测。

2009 年, Xu 和 Lu^[6] 构建了一种基于 MG-MGA 复合物的荧光信号实现 ATP 检测的生物传感器,该团队将 ATP 适配体与 MGA 偶联,又添加了 1 条能与 ATP 适配体和 MGA 相邻部分互补的桥连探针。体系中始终存在 MG,当体系中不存在 ATP 时,桥连探针与 ATP 适配体结合在一起,无法将 MGA 打开,体系无荧光;当体系中存在 ATP 时,ATP 与其适配体结合并将桥连链撬开, MG 可以与 MGA 结合并发生构象变化,荧光信号显著增强。因此,可以通过荧光信号的强弱实现 ATP 的定量检测。该荧光生物传感器借助 MGA 实现荧光信号输出,无需荧光标记,通用性强,可用其他适配体代替 ATP 适配体实现靶物质的检测。

4.2 电化学生物传感器

MGA 具有高特异性识别配体的能力,且与 MG 的亲合力高,因此, MGA 可以作为 MG 的信号识别元件用于 MG 的检测。2014 年,王虹智等^[34] 构建了一种夹心结构的电化学生物传感器,在修饰电极的表面固定能特异性识别并捕获 MG 的适配体,当被检测物质中含有 MG 时,适配体捕获 MG 并将 MG 固定在电极表面,再接上含有辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)的 MG 抗体, HRP 能分解 H_2O_2 产生电化学信号,从而构建了一种可以特异性识别水产品中 MG 的电化学生物传感器。MGA 在该生物传感器中作为信号识别元件,特异性识别被检物质中的 MG,该生物传感器成本低、灵敏度高、操作简单、分析快速。

4.3 比色生物传感器

基于 MGA 的比色生物传感器是以 MGA 作为信号识别探针,通过 MG 与 MGA 的结合实现信号的转化,从而实现 MG 的比色检测。2018 年, Jia 等^[35] 构建了基于 MGA 的比色生物传感器,在该比色生物传感器中, MGA 作为靶物质的识别探针,金纳米粒子作为信号输出元件, MGA 非特异性吸附在金纳米粒子上并阻止金纳米粒子的高盐聚集。若体系中存在 MG, MG 可将吸附在金纳米粒子上的 MGA 剥离,促使金纳米粒子发生聚集,

溶液由红色变为蓝色。利用该比色生物传感器可以实现 MG 的检测,检测限为 15.95 nmol/L。该方法便捷、快速,信号的产生简单,可通过肉眼进行鉴别。

2019 年, Zhao 等^[21] 构建的基于 MGA 与金纳米粒子的比色生物传感器,成功用于检测水产养殖用水中的 MG。该生物传感器利用 MG RNA 适配体作为信号识别元件,实现了 MG 的检测。当 MG 存在时, MG 能与 MGA 高特异性结合,使 CTAB⁺-RNA 适配体的结构解离, CTAB⁺ 释放, CTAB⁺ 可以吸附在柠檬酸盐封装的金纳米粒子表面,使金纳米粒子聚集,抑制金纳米粒子的纳米酶活性,从而抑制金纳米粒子对 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB) 的催化活性,使原体系的蓝色变浅。因此,可以根据体系颜色的变化比色测定 MG 的含量,该比色生物传感器的检测限为 1.8 nmol/L。

4.4 荧光成像

将 MGA 应用于体内研究需要考虑 MG 的毒性。有研究表明,当 MG 浓度低于 10 $\mu\text{mol/L}$ 时,对大肠杆菌的生存没有任何影响^[5]。2018 年, Yerramilli 和 Kim^[36] 提出了一种利用 MGA 进行荧光成像的新策略。研究人员将 MGA 作为荧光探针用于检测细胞中的 RNA,他们将 6 个 MGA 串联以增加 MGA 体系的荧光强度,由于 MGA 与 MG 结合呈现远红外荧光,因此, MGA 可与多种波长在绿色或者黄色荧光范围的荧光蛋白及适配体联合使用。研究人员利用串联的 MGA 和诱导型质粒诱导 MGA 在细菌中表达,结果显示,荧光强度增加了 20 倍且荧光信号稳定,5 $\mu\text{mol/L}$ 的 MG 加入 6 h 之后仍可以检测到荧光信号。而且,当串联的 MGA 与其他荧光 mRNA 及 RNA 适配体一起使用时,这种强的 MG 荧光信号不会被干扰。

5 展望

MGA 与配体的结合亲和力高、特异性强, MGA 依赖配体诱导结合与自适应结合的方式将 MG 包裹在结合口袋中并显著增强 MG 的荧光信号,通过 MG 与 MGA 的结合即可实现 MG 及其他靶物质的荧光检测。MG-MGA 生物传感器克服了传统的荧光标记检测中背景信号强的缺陷,方

便、快速且检测灵敏度高。

目前,已经筛选得到的 MGA 数量较少,筛选方式单一,对于 MGA 的研究主要停留在实验室水平且实际应用较少,无法满足日渐拓宽的检测需求。因此,可以借助更多的筛选方式进行 MGA 的筛选,得到更多具有优良生物学特性的 MGA;同时,也可以通过 MGA 进行劈裂、截短,提高其稳定性及环境耐受性,促进 MGA 更好的应用到实际检测中,为生物传感、荧光成像、疾病诊断等研究领域提供稳定、可靠地检测手段。由于 MG 的高毒性, MG-MGA 生物传感器在体内检测中的应用受到限制,考虑是否可以对 MG 的结构进行改造,从而产生毒性低且能与 MGA 高亲和的 MG 结构衍生物,再通过 MG 衍生物与 MGA 的结合来实现靶物质的体内检测。同时,可将 MGA 与纳米粒子相结合来改变纳米酶的活性,从而调控纳米酶的催化活性,拓宽纳米酶的催化范围,实现高灵敏度的靶物质检测。此外, MGA 还可以通过一定的扩增手段形成水凝胶并进入水生生物的细胞内,实现对于水生生物体内 MG 含量的检测。

参 考 文 献

- [1] 仇国苏, 张旭东, 陈仕功. 认识孔雀石绿[J]. 化学教育, 2007, 28(5): 2.
- [2] 张佳艳, 伍金娥, 常超. 孔雀石绿的毒理学研究进展[J]. 粮食科技与经济, 2011 (3): 43-47.
- [3] 季宇彬, 孙莹, 张青扬, 等. 新型孔雀石绿衍生物的合成及其生物活性研究[J]. 中国医药生物技术, 2018, 13(1): 24-30.
- [4] TRACHMAN III R J, TRUONG L, FERRÉ-D'AMARÉ A R. Structural principles of fluorescent RNA aptamers[J]. Trends Pharmacol. Sci., 2017, 38(10): 928-939.
- [5] KRAUS G, JEON I, NILSEN-HAMILTON M, *et al.* Fluorinated analogs of malachite green: Synthesis and toxicity[J]. Molecules, 2008, 13(4): 986-994.
- [6] XU W, LU Y. Label-free fluorescent aptamer sensor based on regulation of malachite green fluorescence[J]. Anal. Chem., 2009, 82(2): 574-578.
- [7] BABENDURE J R, ADAMS S R, TSIEN R Y. Aptamers switch on fluorescence of triphenylmethane dyes[J]. J. Am. Chem. Soc., 2003, 125(48): 14716-14717.
- [8] ELLINGTON A D, SZOSTAK J W. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands[J]. Nature, 1990, 346(6287): 818-822.
- [9] GRATE D, WILSON C. Laser-mediated, site-specific inactivation of RNA transcripts[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, 96(11): 6131-6136.
- [10] NGUYEN D H, DEFINA S C, FINK W H, *et al.* Binding to an RNA aptamer changes the charge distribution and conformation of malachite green[J]. J. Am. Chem. Soc., 2002, 124(50): 15081-15084.
- [11] BAUGH C, GRATE D, WILSON C. 2.8 Å crystal structure of the malachite green aptamer[J]. J. Mol. Biol., 2000, 301(1): 117-128.
- [12] DA COSTA J B, ANDREIEV A I, DIECKMANN T. Thermodynamics and kinetics of adaptive binding in the malachite green RNA aptamer[J]. Biochemistry, 2013, 52(38): 6575-6583.
- [13] SOKOŁOSKI J E, DOMBROWSKI S E, BEVILACQUA P C. Thermodynamics of ligand binding to a heterogeneous RNA population in the malachite green aptamer[J]. Biochemistry, 2011, 51(1): 565-572.
- [14] BRACKETT D M, DIECKMANN T. Aptamer to ribozyme: The intrinsic catalytic potential of a small RNA[J]. ChemBiochem, 2006, 7(5): 839-843.
- [15] DA COSTA J B, DIECKMANN T. Entropy and Mg^{2+} control ligand affinity and specificity in the malachite green binding RNA aptamer[J]. Mol. BioSyst., 2011, 7(7): 2156-2163.
- [16] NGUYEN D H, DIECKMANN T, COLVIN M E, *et al.* Dynamics studies of a malachite green-RNA complex revealing the origin of the red-shift and energetic contributions of stacking interactions[J]. J. Phys. Chem. B, 2004, 108(4): 1279-1286.
- [17] CHEN A, YAN M, YANG S. Split aptamers and their applications in sandwich aptasensors[J]. TrAC-Trend. Anal. Chem., 2016, 80: 581-593.
- [18] SUN Y, YUAN B, DENG M, *et al.* A light-up fluorescence assay for tumor cell detection based on bifunctional split aptamers[J]. Analyst, 2018, 143(15): 3579-3585.
- [19] KENT A D, SPIROPULOS N G, HEEMSTRA J M. General approach for engineering small-molecule-binding DNA split aptamers[J]. Anal. Chem., 2013, 85(20): 9916-9923.
- [20] KOLPASHCHIKOV D M. Binary malachite green aptamer for fluorescent detection of nucleic acids[J]. J. Am. Chem. Soc., 2005, 127(36): 12442-12443.
- [21] ZHAO C, HONG C, LIN Z, *et al.* Detection of malachite green using a colorimetric aptasensor based on the inhibition of the peroxidase-like activity of gold nanoparticles by cetyltrimethylammonium ions[J/OL]. Microchim. Acta, 2019, 186(5): 322 [2019-10-25]. <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3436-3>.
- [22] XIAO X, ZHU L, HE W, *et al.* Functional nucleic acids tailoring and its application[J]. TrAC-Trend. Anal. Chem., 2019, 118: 138-157.
- [23] LUO X, CHEN Z, LI H, *et al.* Exploiting the application of l-aptamer with excellent stability: An efficient sensing platform for malachite green in fish samples[J]. Analyst, 2019, 144(14): 4204-4209.
- [24] STEAD S L, ASHWIN H, JOHNSTON B H, *et al.* An RNA-aptamer-based assay for the detection and analysis of malachite green and leucomalachite green residues in fish tissue[J]. Anal. Chem., 2010, 82(7): 2652-2660.
- [25] ZHOU Y, CHI H, WU Y, *et al.* Organic additives stabilize RNA aptamer binding of malachite green[J]. Talanta, 2016,

- 160: 172–182.
- [26] WANG T J. Function and dynamics of aptamers: A case study on the malachite green aptamer[D]. Ames, Iowa: Iowa State University, Doctoral Dissortation, 2008.
- [27] WANG H, WANG J, SUN N, *et al.*. Selection and characterization of malachite green aptamers for the development of light-up probes[J]. *Chem. Select*, 2016, 1(8): 1571–1574.
- [28] HONG E S, YOON H J, KIM B, *et al.*. Mass spectrometric studies of alkali metal ion binding on thrombin-binding aptamer DNA[J]. *J. Am. Soc. Mass Spectr.*, 2010, 21(7): 1245–1255.
- [29] UDA R M, MATSUI T, TAKEI M. Binding of malachite green promotes stability and shows preference for a human telomere DNA G-quadruplex[J]. *Supramol. Chem.*, 2017, 29(8): 553–560.
- [30] LI S, LIU H, YANG G, *et al.*. Detection of radon with biosensors based on the lead (II)-induced conformational change of aptamer HTG and malachite green fluorescence probe[J]. *J. Environ. Radioactiv.*, 2018, 195: 60–66.
- [31] CHEN Y, WANG J, ZHANG Y, *et al.*. Selection and characterization of a DNA aptamer to crystal violet[J]. *Photoch. Photobio. Sci.*, 2018, 17(6): 800–806.
- [32] DARZYNKIEWICZ Z, KAPUSCINSKI J, CARTER S P, *et al.*. Cytostatic and cytotoxic properties of pyronin Y: Relation to mitochondrial localization of the dye and its interaction with RNA[J]. *Cancer Res.*, 1986, 46(11): 5760–5766.
- [33] UDA R M, NISHIMOTO N, MATSUI T, *et al.*. Photoinduced binding of malachite green copolymer to parallel G-quadruplex DNA[J]. *Soft Matter*, 2019, 15: 4454–4459.
- [34] 王虹智, 黄加栋, 于京华, 等. 一种检测孔雀石绿的核酸适配体电化学生物传感器的制备方法及应用: CN103713026A [P]. 2014-04-09.
- [35] JIA J, YAN S, LAI X, *et al.*. Colorimetric aptasensor for detection of malachite green in fish sample based on RNA and gold nanoparticles[J]. *Food Anal. Method.*, 2018, 11(6): 1668–1676.
- [36] YERRAMILI V S, KIM K H. Labeling RNAs in live cells using malachite green aptamer scaffolds as fluorescent probes[J]. *ACS Synth. Biol.*, 2018, 7(3): 758–766.