

金属元素探针标记策略的研究进展

胡悦莉¹ 张程超¹ 李嫣¹ 位艳雪² 刘睿¹ 吕弋^{*1,2}

(四川大学 化学学院¹, 分析测试中心², 成都 610064)

摘 要 金属元素探针标记策略是将金属元素标记在生物分子上并作为信号探针,通过生物识别,联用电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)实现对生物分子的定量分析。金属元素标记与 ICP-MS 技术联用的方法具有灵敏度高、分辨率高和基质效应低等独特优势,拓展了生物分子定量分析的研究思路。金属元素标记策略已被广泛应用于生物分析领域,能够实现灵敏分析和多组分同时检测,并克服了生物分子所处复杂环境产生的干扰,具有良好的应用前景。本文从金属元素探针标记策略出发,系统总结了金属离子标记策略、金属纳米颗粒标记策略、DNA 模板化金属纳米颗粒的无标记策略的发展概况,分析了其优缺点,综述了金属元素探针标记策略在生物分子高灵敏度分析和多重检测中的应用研究进展,并展望了其未来的发展趋势。

关键词 金属元素探针; 标记策略; 电感耦合等离子体质谱; 生物分子; 评述

2001 年,清华大学张新荣课题组^[1]在对促甲状腺激素的研究工作中率先提出了金属元素探针标记策略。自此之后,基于金属元素标记的分析方法研究受到了广泛关注,已经开发出了 DNA 和蛋白质等生物分子以及爆炸物和纳米塑料等环境污染物的定量分析方法^[2-6]。生物体复杂精密,由核酸和蛋白质等多种生物分子共同构成,其中,核酸是生命的遗传密码,蛋白质是生命活动的执行者^[7]。这些生物分子在机体内的相互作用对于生物体的生长、发育和衰老等生命过程具有重要的调节作用^[8]。在疾病的发生发展过程中,生物分子的种类和数量会发生变化,因此,对人体内的生物分子进行精确分析对于疾病的预防和早期诊断具有重要意义^[9-12]。

金属元素标记与电感耦合等离子体质谱(Inductively coupled plasma-mass spectrometry, ICP-MS)技术联用的方法具有灵敏度高、可进行多重分析以及基质效应低等独特优势,拓宽了生物分子定量分析的研究思路。近二十年来,研究者开发了很多基于金属元素标记构建的生物分子高效检测方法,实现了灵敏分析和多组分同时检测,并有效克服了生物体复杂基质环境对生物分子的干扰,在生物分析领域展现出良好的应用前景。本文从金属元素探针标记策略出发,系统地总结了近十年来常用的标记策略及其发展,并讨论了其优缺点,介绍了金属元素探针在生物分子高灵敏度分析和多重检测中的应用研究进展,最后对其发展趋势进行了展望。

1 金属元素标记的优势及检测原理

1.1 金属元素标记的优势

基于金属元素标记策略的研究中,检测金属元素的仪器通常为 ICP-MS^[2]。利用 ICP-MS 对金属元素进行分析具有许多优势:(1)由于来自标记中的金属原子可被直接检测,因此不需要其在电学和光学等方面具有特殊性质;(2)多数的元素和同位素都能够通过 ICP-MS 进行分析,并且可实现低至 pg/mL 量级的检测^[13];(3)金属元素标记策略中可供选择的金属元素较多,得益于 ICP-MS 优异的谱线分辨率,能有效实现多组分同时检测,并且不存在如荧光检测中多波长激发谱带重叠的问题^[14]。

1.2 生物分子的检测原理

将金属离子或纳米颗粒标记在生物分子上形成信号探针,再通过 DNA 链间互补配对或抗原-抗体相互作用等生物识别方式与目标物结合,进而引起 ICP-MS 中金属信号发生改变^[15-16]。以简单的三明治结构检测核酸或蛋白质为例阐述金属元素标记策略的检测原理,如图 1 所示^[17]。首先,将金属纳米颗粒与核酸或抗体结合,形成信号探针,相应的生物分子通过链霉亲和素和生物素相互作用预先结合在磁珠表面。然后,在目标分子存在下,通过碱基互补配对原则或抗原抗体识别,金属纳米颗粒会被连接到磁珠表面,磁分离后被硝酸解,最后进行 ICP-MS 检测,从而实现定量分析。

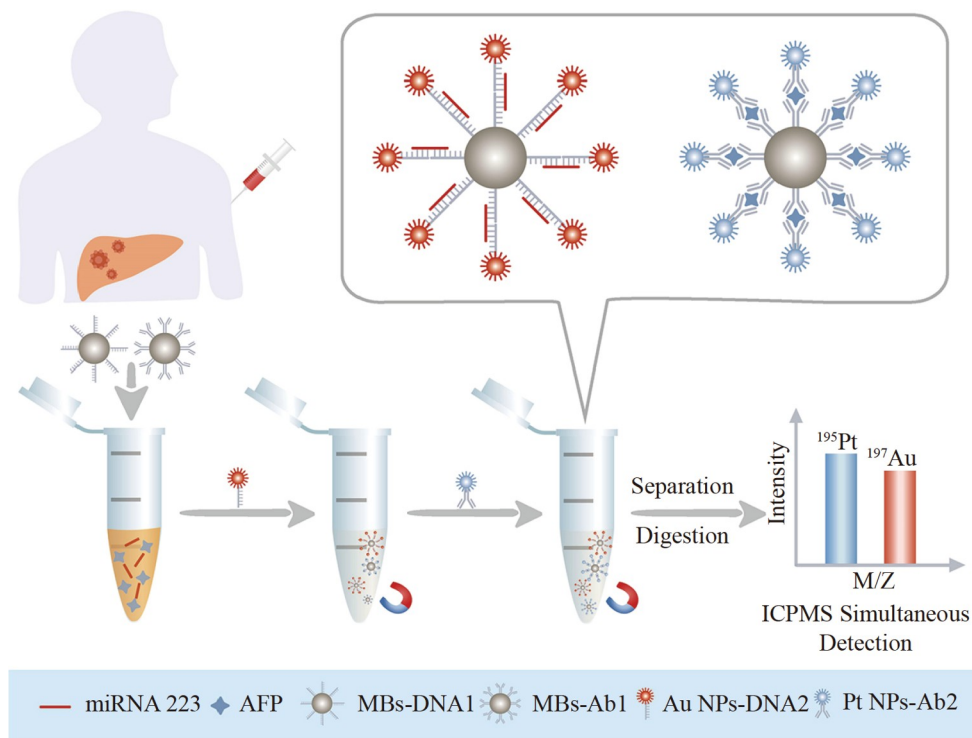


图1 简单三明治结构检测生物分子的示意图^[17]

Fig.1 Schematic diagram of biomolecule detection in simple sandwich structure^[17]

2 金属元素探针标记策略

生物体内存在的 S 和 P 等元素能够被直接应用于生物分子的定量分析,但是,元素的低离子化效率和光谱干扰使得该分析方法的检出限较高^[18]。引入金属元素标记策略,能够有效提高方法的灵敏度。目前,金属元素标记策略主要分为金属离子标记策略、金属纳米颗粒标记策略和 DNA 模板化金属纳米颗粒的无标记策略。

2.1 金属离子标记策略

金属离子标记策略是将 1,4,7,10 四氮杂环十二烷-1,4,7-三乙酸-10-马来酰亚胺乙基乙酰胺(MMA-DOTA)大环化合物与金属离子螯合,形成的复合物通过加成反应与带有巯基修饰的 DNA 连接,完成金属离子标记,标记过程如图 2 所示^[19]。王秋泉研究组^[20-22]致力于对肽段进行金属元素标记;谭蔚泓研究组^[23]以二乙烯三胺五乙酸(DTPA)为基元合成了一种新型聚合物,用于螯合多种金属离子,合成了一系列核酸适配体-金属标签探针。目前,金属离子标记策略最常用的是镧系金属元素,由于其在生物体内的含量很低,将其作为元素标签能够获得优异的分析性能。

镧系金属元素共有 15 种,其中, Tb、Ho 和 Tm 为单同位素元素(¹⁵⁹Tb、¹⁶⁵Ho 和 ¹⁶⁹Tm),通常被作为检测生物分子的元素标签,完成多组分分析。但是,金属离子标记策略的缺点也很明显,即 1 个目标物仅

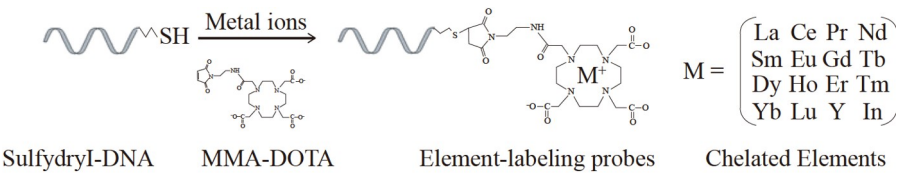


图2 金属离子标记示意图^[19]
Fig.2 Schematic diagram of metal ion tagging^[19]

对应 1 个金属离子,可能出现灵敏度较低的问题。针对上述问题,有研究者采用将多个金属离子通过高分子材料结合在一个生物分子上的标记策略,以此提高检测灵敏度^[24];还有研究者利用四面体 DNA、多组分核酸酶等提高检测灵敏度^[25-27]。

2.2 金属纳米颗粒标记策略

随着纳米科学技术的快速发展,考虑到金属离子标记策略存在的不足,研究者开发了金属纳米颗粒标记策略以提高分析方法的灵敏度^[28]。与金属离子相比,金属纳米颗粒内含有大量可被检测到的金属原子,例如,1 颗直径为 10 nm 的金纳米颗粒(AuNPs)中约含有 30000 个金原子^[29]。常用的金属纳米颗粒有金、银、铂纳米颗粒和镧系金属元素纳米颗粒,由于不需要金属纳米颗粒具有特殊性质,金属纳米簇也被作为元素标记应用在实际研究工作中^[30-32]。

AuNPs 是在实际应用中使用的最多的纳米颗粒,AuNPs 的 DNA 标记方法主要为盐老化法,操作复杂且耗时长^[33]。近年来,已开发出冷冻法、微波法和蒸发干燥法等一系列简单且快速的标记方法将 DNA 或蛋白质标记在 AuNPs 表面^[34-37]。其中,冷冻法已被广泛应用于金属元素标记策略,标记原理如图 3 所示。该方法简单方便,标记过程可在短时间内完成,DNA 负载量更高,适用于多尺寸的 AuNPs。

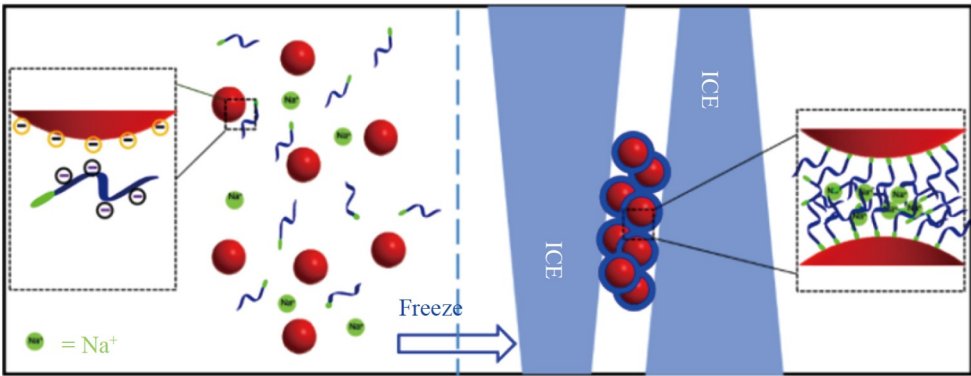


图3 冷冻法标记金纳米颗粒(AuNPs)的示意图^[34]
Fig.3 Schematic diagram of attaching DNA onto gold nanoparticles (AuNPs) by freezing^[34]

使用 AuNPs 较易获得高灵敏度,并且制备简单,尺寸在 2~100 nm 范围内的 AuNPs 可以满足不同的需求。但是,与镧系金属离子相比,金属纳米颗粒不够稳定,并且非特异性干扰较大,在多重检测应用中受限。虽然 AuNPs 标记生物分子的方法得到了较好的优化,但是对于银和铂等其它纳米颗粒简单快速的标记方法目前仍存在较大挑战。

2.3 DNA 模板化金属纳米颗粒的无标记策略

除了上述金属离子标记策略和金属纳米颗粒标记策略两种方式外,DNA 模板化金属纳米颗粒的无标记策略也备受关注。当还原剂存在时,以单链 DNA 为模板,溶液中的金属离子可被还原形成纳米颗粒,例如金、银和铜纳米颗粒^[3,38-39],如图 4 所示。大部分纳米颗粒模板化合成都需要较长的时间,但是模板化合成铜纳米颗粒只需要 5 min,该方法已被应用于生物分子的定量分析^[40]。

DNA 模板化金属纳米颗粒表现出的物理和化学性质在很大程度上受 DNA 模板设计的影响,例如,

AuNPs 杂交形成双链体,进而被双链特异性核酸酶(DSN)切割,释放 AuNPs。选择性功能化使得 DSN 的每次切割都能释放 AuNPs,极大地提高了分析方法的灵敏度,检出限低至 0.47 fmol/L。

采用时间分辨模式下的 Sp-ICP-MS 对充分稀释的金属纳米颗粒悬浮液中的单个纳米颗粒进行检测,其中,信号频率与纳米颗粒的浓度直接相关,瞬时信号强度与纳米颗粒大小直接相关。Sp-ICP-MS 可区分单个纳米颗粒在大小和浓度方面的信号差异,防止该差异在平均信号中被掩盖,这是降低背景信号的有效方式。Xu 等^[52]利用不同尺寸的 AuNPs 在 Sp-ICP-MS 中产生的信号差异,基于滚环扩增技术对 DNA 进行高灵敏检测,检出限低至 5.1 fmol/L。

3.2 金属元素标记策略在多组分同时分析中的研究进展

同时对多种生物分子进行分析能够降低检测成本,简化检测步骤,是生命科学等领域关注的热点问题,ICP-MS 的多重分析能力为解决上述问题提供了新的选择。序列的高度相似性和生物系统的复杂性使得鉴别多个同源序列面临挑战。基于镧系元素标记并结合逻辑门, Kang 等^[53]成功开发了高特异性准确鉴别 let-7 家族中 8 种 miRNA 的分析平台,并可扩展到更多类型的同源序列分析。Li 等^[54]通过金属纳米颗粒标记策略,对疾病标志物甲胎蛋白和亚型甲胎蛋白 L3 进行同时分析,为肝癌的早期诊断提供了技术支持。目前,针对同种疾病,同时检测两种或多种标志物已成为单标记物分析的替代方法。Li 等^[17]探索了针对肝癌疾病标志物 miRNA 223 和 AFP 同时分析的方法,将核酸和蛋白质混合后进行 ICP-MS 多重测定,扩展了多重检测的生物分子种类。此外, Wen 等^[55]基于镧系金属纳米颗粒标记,通过纳米卫星和催化发夹组装实现了对 10 种 miRNA 的同时分析,该方法具有超高灵敏度,检出限低至 0.01 fmol/L; 通过机器算法分析,该方法对多种 miRNA 信号实现了准确诊断和分类,适用于临床无创癌症筛查。

SARS-CoV-2 在全世界范围内流行对公共卫生安全产生了严重影响,由此衍生的多种 SARS-CoV-2 变异株也导致发生了多批次流行性感染。为了解决 SARS-CoV-2 变体诊断对灵敏度和多重性的需求, Li 等^[56]构建了三价的 DNA 四面体纳米结构用于金属元素标记,可同时鉴别 3 种变异的 Omicron 变体(图 6)。DNA 四面体中 1 个顶点用于连接磁珠,其它 3 个顶点用于标记镧系金属离子并输出信号,这种独特的多顶角结构使其成为理想的多组分生物分析平台。此外,四面体结构为后续反应提供了可控的纳米级空间距

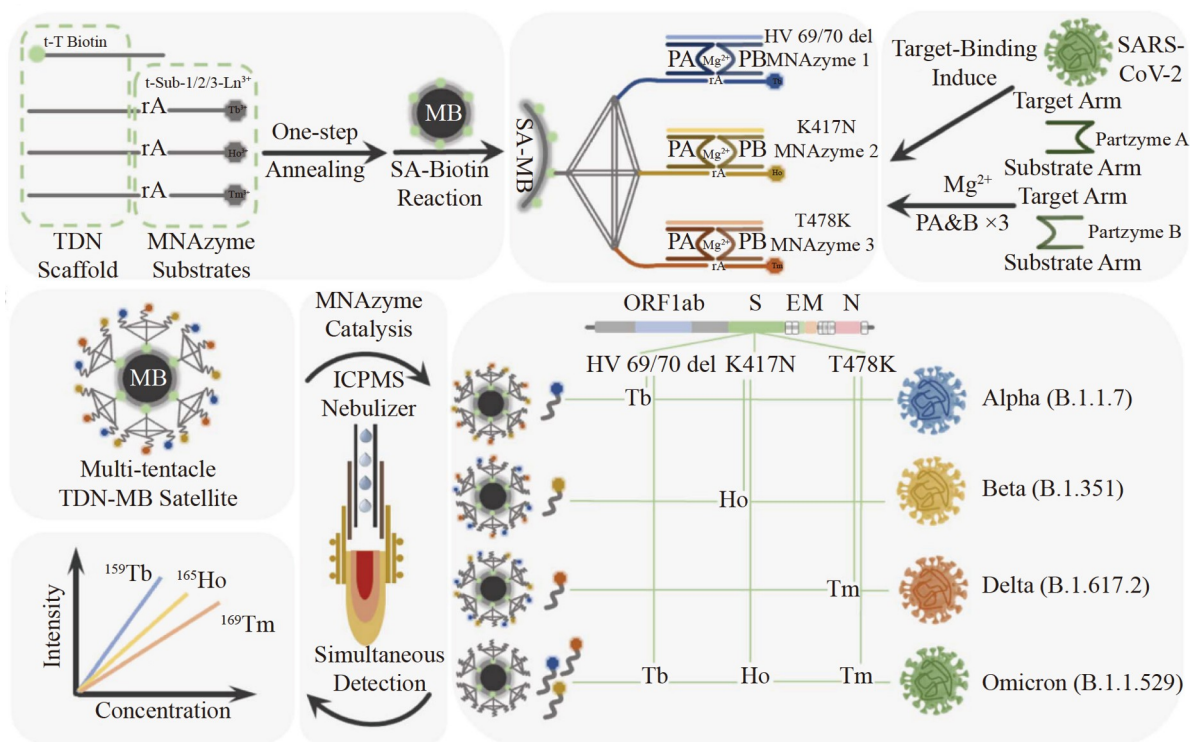


图6 同位素编码的 DNA 四面体用于多重 SARS-CoV-2 变异诊断的示意图^[56]

Fig.6 Schematic diagram of isotope-encoded tetrahedral DNA for multiple SARS-CoV-2 variant diagnosis^[56]

离,有效减少了非特异性吸附,分析性能优于单链 DNA 探针。

4 总结与展望

金属元素标记策略的研究发展迅速,基于金属元素标记的生物分析方法具有以下优势:(1)灵敏度高,可显著提升检测性能,融合元素标记策略和 Sp-ICP-MS 两者的优势可在无需任何信号放大的情况下,实现高灵敏的生物分析;(2)可进行多组分分析,数量高达上百种的同位素使得高通量多组分灵敏分析在生物检测领域发挥了不可替代的作用;(3)具有良好的生物相容性与稳定性,通过采用生物相容性良好且不含其它特殊性质的金属同位素对不同生物分子进行稳定标记,确保了对细胞和生物分子的低毒性和低干扰;(4)拥有灵活性与可定制性,元素标记策略可根据不同的实际需求进行定制,选择适合的金属同位素和标记方式。基于以上优势,金属元素标记策略在多种生物传感器的构建方面具有广阔的应用前景。例如,ICP-TOF-MS 以及飞行时间流式细胞仪(CyTOF 或流式细胞仪)可以精确地定量分析细胞表面不同的金属同位素。因此,金属元素标记策略在不同生物分子分析方法中的应用将为开发更实用、准确和高效的分析技术提供更广泛的思路。

References

- [1] ZHANG C, WU F, ZHANG Y, WANG X, ZHANG X. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2001, 16(12): 1393-1396.
- [2] HU J, DENG D, LIU R, LV Y. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2018, 33(1): 57-67.
- [3] HU J, WANG C, LIU R, SU Y, LV Y. *Anal. Chem.*, 2018, 90(24): 14469-14474.
- [4] JIMÉNEZ-LAMANA J, MARIGLIANO L, ALLOUCHE J, GRASSL B, SZPUNAR J, REYNAUD S. *Anal. Chem.*, 2020, 92(17): 11664-11672.
- [5] YAN X, LUO Y, ZHANG Z, LI Z, LUO Q, YANG L, ZHANG B, CHEN H, BAI P, WANG Q. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2012, 51(14): 3358-3363.
- [6] YAN X, YANG L, WANG Q. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2011, 50(22): 5130-5133.
- [7] DHANJAI, SINHA A, LU X, WU L, TAN D, LI Y, CHEN J, JAIN R. *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2018, 98: 174-189.
- [8] LI Y, XIA C, ZHAO H, XIE Y, ZHANG Y, ZHANG W, YU Y, WANG J, QIN W. *Chin. Chem. Lett.*, 2023, 34(2): 107377.
- [9] WANG M, LIU H, FAN K. *Small Methods*, 2023, 7(11): 2301049.
- [10] JI C, LIANG Y, GE F, YANG L, WANG Q. *Anal. Chem.*, 2019, 91(11): 7032-7038.
- [11] WANG Y, CHEN J, WANG G, YU Y, WANG J, QIU H. *Sens. Actuators, B*, 2022, 359: 131555.
- [12] WEN Y, LIU W Y, WANG J H, YU Y L, CHEN S. *Anal. Chem.*, 2023, 95(32): 12152-12160.
- [13] LI Z, LIU R, LV Y. *Appl. Spectrosc. Rev.*, 2023, 58(1): 39-64.
- [14] LIU R, ZHANG S, WEI C, XING Z, ZHANG S, ZHANG X. *Acc. Chem. Res.*, 2016, 49(5): 775-783.
- [15] JIANG M, HUANG Z, ZHAO X, LIU R, LV Y. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2021, 36(2): 279-284.
- [16] SUN G, HUANG B, ZHANG Y, ZHANG Y, XING Z, ZHANG S, ZHANG X. *Chem. Commun.*, 2017, 53(97): 13075-13078.
- [17] LI Y, HUANG Z, LI Z, LI C, LIU R, LV Y. *Anal. Chem.*, 2022, 94(49): 17248-17254.
- [18] HU J, LI Z, ZHANG H, LIU R, LV Y. *Anal. Chem.*, 2020, 92(12): 8523-8529.
- [19] HAN G, ZHANG S, XING Z, ZHANG X. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2013, 52(5): 1466-1471.
- [20] JIN X, YANG L, YAN X, WANG Q. *ACS Chem. Neurosci.*, 2021, 12(7): 1093-1099.
- [21] LIU C, LI P, YAN X, YANG L, LIU P, WANG Q. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2023, 416(11): 2691-2697.
- [22] ZHAO W, LIANG Y, YAN X, YANG L, WANG Q. *Biochemistry*, 2020, 59(38): 3523-3528.
- [23] XU L, FENG Y, WANG T, LI S, XU K, SUN Y, LUO Y, YE Y, MIAO Y, DONG Y, GUO Z, ZHANG Q, LI B, HUANG H, WANG X Q, QIU L, TAN W. *CCS Chem*, 2024, 6(1): 196-207.
- [24] LOU X, ZHANG G, HERRERA I, KINACH R, ORNATSKY O, BARANOV V, NITZ M, WINNIK M. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2007, 46(32): 6111-6114.
- [25] LIU S, WU J, HE M, CHEN B, KANG Q, XU Y, YIN X, HU B. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2021, 13(49): 59076-59084.
- [26] KANG Q, HE M, CHEN B, XIAO G, HU B. *Anal. Chem.*, 2021, 93(2): 737-744.
- [27] HUANG Z, WANG C, LIU R, SU Y, LV Y. *Anal. Chem.*, 2020, 92(3): 2876-2881.
- [28] ZHANG C, ZHANG Z, YU B, SHI J, ZHANG X. *Anal. Chem.*, 2002, 74(1): 96-99.
- [29] LIU R, WU P, YANG L, HOU X, LV Y. *Mass Spectrom. Rev.*, 2014, 33(5): 373-393.
- [30] ZHANG S, HAN G, XING Z, ZHANG S, ZHANG X. *Anal. Chem.*, 2014, 86(7): 3541-3547.

- [31] CHEN X, SONG H, LI Z, LIU R, LV Y. *Anal. Chem.* , 2021, 93(40): 13719-13726.
- [32] CRUZ-ALONSO M, FERNANDEZ B, GARCÍA M, GONZÁLEZ-IGLESIAS H, PEREIRO R. *Anal. Chem.* , 2018, 90(20): 12145-12151.
- [33] WANG C, ZHAO X, LIU R, ZHONG Z, HU J, LV Y. *Chem. Commun.* , 2019, 55(72): 10665-10668.
- [34] LIU B, LIU J. *J. Am. Chem. Soc.* , 2017, 139(28): 9471-9474.
- [35] HUANG M, XIONG E, WANG Y, HU M, YUE H, TIAN T, ZHU D, LIU H, ZHOU X. *Nat. Commun.* , 2022, 13(1): 968.
- [36] YE Y, HAO Y, YE M, SONG X, DENG Z. *Small*, 2022, 18(24): 2202458.
- [37] HU M, YUAN C, TIAN T, WANG X, SUN J, XIONG E, ZHOU X. *J. Am. Chem. Soc.* , 2020, 142(16): 7506-7513.
- [38] CHEN W Y, LAN G Y, CHANG H T. *Anal. Chem.* , 2011, 83(24): 9450-9455.
- [39] QING Z, HE X, HE D, WANG K, XU F, QING T, YANG X. *Angew. Chem. Int. Ed.* , 2013, 52(37): 9719-9722.
- [40] LIU R, HU J, CHEN Y, JIANG M, LV Y. *Anal. Chem.* , 2019, 91(13): 8691-8696.
- [41] LIU Y, HUSSAIN M, WANG C, YANG H, WANG K, WEI J, LONG L, DING L, QIAN J. *Anal. Chem.* , 2024, 96(25): 10391-10398.
- [42] LV M, ZHOU W, FAN D, GUO Y, ZHU X, REN J, WANG E. *Adv. Mater.* , 2020, 32(17): 1908480.
- [43] ZHOU W, ZHU J, FAN D, TENG Y, ZHU X, DONG S. *Adv. Funct. Mater.* , 2017, 27(46): 1704092.
- [44] GUO Y, LV M, REN J, WANG E. *Small*, 2020, 17(3): 2006553.
- [45] LIU R, LIU X, TANG Y, WU L, HOU X, LV Y. *Anal. Chem.* , 2011, 83(6): 2330-2336.
- [46] LI Z, CHEN X, HUANG Z, ZHOU J, LIU R, LV Y. *Anal. Chem.* , 2021, 93(37): 12714-12722.
- [47] ZHOU J, HU J, LIU R, WANG C, LV Y. *Chem. Commun.* , 2022, 58(26): 4247-4250.
- [48] WANG Q, LIU L, CHEN X, WANG T, ZHOU H, HUANG H, QING L, LUO P. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2022, 14(3): 3633-3642.
- [49] JIANG M, ZHOU J, XIE X, HUANG Z, LIU R, LV Y. *Anal. Chem.* , 2022, 94(44): 15433-15439.
- [50] HU Y, LIU L, WANG C, ZHOU J, LIU R, LV Y. *Chem. Commun.* , 2024, 60(8): 976-979.
- [51] CHEN B, XIAO G, HE M, HU B. *Anal. Chem.* , 2021, 93(27): 9454-9461.
- [52] XU Y, XIAO G, CHEN B, HE M, HU B. *Anal. Chem.* , 2022, 94(28): 10011-10018.
- [53] KANG Q, CHEN B, HE M, HU B. *Anal. Chem.* , 2024, 96(16): 6329-6336.
- [54] LI Z, LI H, DENG D, LIU R, LV Y. *Anal. Chem.* , 2020, 92(7): 4807-4813.
- [55] WEN Y, ZHANG X W, LI Y Y, CHEN S, YU Y L, WANG J H. *Anal. Chem.* , 2022, 94(46): 16196-16203.
- [56] LI Z, ZHOU J, WANG C, LIU R, HU J, LV Y. *Chem. Sci.* , 2023, 14(24): 6654-6662.

Research Progress in Metal Element Probe Tagging Strategies

HU Yue-Li¹, ZHANG Cheng-Chao¹, LI Yan¹, WEI Yan-Xue², LIU Rui¹, LYU Yi^{*1,2}

¹(College of Chemistry, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

²(Analytical & Testing Centre, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract The metal element probe labeling strategy involves marking biomolecules with metal elements as signal-generating units and performing quantitative analysis of biomolecules through inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). The combination of metal element labeling and ICP-MS technology offers significant advantages, including high sensitivity, high resolution, and low matrix effects, thereby expanding the approaches for quantitative analysis of biomolecules. This strategy has been widely applied in bioanalysis for broad purposes including disease diagnosis (or predication) and environmental regulation. Such an approach enables sensitive analysis and simultaneous detection of multiple components while overcoming interference from complex biological environments, presenting substantial application prospects. Over the past two decades, numerous research works have been reported in this area. Based on the abovementioned characteristics of the metal element labeling strategy, in this paper, the development of current labeling strategies based on metal element probe labeling were systematically reviewed, the advantages and disadvantages were discussed, the applications in high-sensitivity analysis and multiplex detection of biomolecules were reviewed, and an outlook on future development trends of this technology was provided.

Keywords Metal probe; Tagging strategy; Inductively coupled plasma mass spectrometry; Biomolecule; Review

(Received 2024-06-13; accepted 2024-09-12)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 22074096, 22374105, 22074098).