

基于核酸电化学适体生物传感器的研究进展

付 虎 综述, 易 钢[△] 审校

(重庆医科大学检验医学院, 重庆 400016)

关键词: 适体, 核苷; 电化学; 生物传感技术; 综述**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.18.024**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2012)18-2222-03

生物传感器作为一种新兴技术,具有快速、灵敏、高通量等优点,可以满足临床诊断和环境监测的需要^[1]。生物传感器由识别元件、理化换能器及信号放大装置构成^[2]。在其设计中,抗体和核酸是最常用的分子识别元件。目前,抗体制备主要依靠单克隆技术,其制备周期长、成本高;抗体对 pH、温度等环境要求较高,贮存时间较短,这些因素限制了抗体在生物传感器中的应用^[3]。适体是通过指数富集的配体系统进化(SEL-EX)技术筛选出的 1 段可以与蛋白、微生物、有机小分子等特异性结合的 DNA 或 RNA 核苷酸序列^[4-5],其可以在很多应用中代替抗体。与传统抗体相比,适体具有以下显著特点:可通过化学合成,成本低、周期短;易于功能化修饰;环境耐受性强,不易失活,贮存时间长^[3]。适体作为分子识别元件,已发展了多种灵敏的生物传感器,如电化学传感器、荧光传感器、表面等离子共振传感器、比色传感器等^[6-9]。其中电化学传感器具有灵敏度高、成本低等显著特点,受到广泛关注。本文将根据“标记型”与“非标记型”的分类方式对近年来电化学适体传感器在临床诊断中的应用与发展进行综述。

1 标记型电化学适体生物传感器

标记型电化学适体生物传感器是将氧化还原分子、酶、纳米粒子等标记物标记在适体上,根据分子识别前后,标记物产生的电化学信号改变进行检测的传感器。此类传感器灵敏度高,但操作繁琐,成本相对较高。

1.1 基于氧化还原分子标记的电化学适体生物传感器 此类传感器常常以亚甲基蓝、二茂铁、蒽醌复合物等氧化还原探针标记适体,当适体与靶体发生特异性结合时,适体构象发生变化,导致氧化还原探针分子的状态或数量改变,进一步引起电信号改变。根据产生信号的原理不同,又可分为“单链型”和“双链型”两类。

1.1.1 “单链型”电化学适体生物传感器 适体与靶体结合后,适体发生折叠或舒展,改变氧化还原分子与电极表面的距离,从而引起电化学信号的改变。Xiao 等^[10]将亚甲基蓝标记的凝血酶适体组装在金电极表面,实现了对凝血酶的检测。Ferapontova 等^[11]首次报道了 RNA 电化学适体传感器检测胆茶碱。Liu 等^[12]设计了 1 种分子灯塔型的电化学适体传感器用于血清中 IFN- γ 的检测,检测限可以达到 60 pmol/L。

1.1.2 “双链型”电化学适体生物传感器 当靶体与互补核酸同时引入核酸适体体系时,适体-靶体、适体-互补核酸处于竞争平衡状态,通过控制温度、盐离子浓度、pH 等条件,可以促进靶体与适体三级结构的形成。Xiao 等^[13]将含有 2 个双螺旋区域的 DNA 双链自组装在金电极表面,上端的双螺旋区域中的 1 条单链包含凝血酶适体序列,另 1 条单链标记有亚甲基蓝

探针,对凝血酶的检测限达到了 3×10^{-9} mol/L。Liu 等^[14]则首先在玻碳电极表面构建一层多壁碳纳米管传感界面,然后依次组装捕捉探针、二茂铁标记的凝血酶适体,于多壁碳纳米管可以增大电子传递效率,极大地提高了传感器的灵敏度,检测限达 5×10^{-13} mol/L。

1.2 基于酶标记的电化学适体传感器 与 ELISA 中的酶放大信号原理相似,基于酶标记的电化学适体传感器也是利用酶的催化作用放大信号。Centi 等^[15]在磁珠表面依次固定 15 碱基的凝血酶适体、凝血酶、29 碱基的凝血酶适体和碱性磷酸酶,构建“三明治”结构,并通过磁场分离实现对血浆中凝血酶的检测。Bonel 等^[6]报道了一种基于竞争法的酶标记的适体传感器用于郝曲毒素的检测,检测下限达 70 ng/L。G-四链体-hemin DNA 酶是发展迅速一类新兴 DNA 酶,是通过 SELEX 筛选出来的一段富含鸟嘌呤碱基的 DNA 序列^[16],该 DNA 酶与氯化血红素(hemin)结合而形成的特殊三级结构显示出过氧化物酶活性。Pelossof 等^[17]设计的 1 条包括 G-四链体-hemin DNA 酶序列和单磷酸腺苷(AMP)适体序列寡核苷酸链,引入相应的序列构成夹夹结构,通过循环伏安法检测,检测下限可达 1 μ mol/L。与天然辣根过氧化物酶相比,G-四链体-hemin DNA 酶具有成本低、易于储存等一系列优势,但其催化活性低于天然辣根过氧化物酶,通过与纳米粒子或磁性富集技术的联合应用,此类传感器的灵敏度有望得到提高。

1.3 基于纳米粒子标记的电化学适体传感器 纳米粒子在生物传感器中作为标记物,既可用于增敏,也可作为信号的来源。Zheng 等^[18]将凝血酶适体及其互补链分别标记在磁性纳米粒子和金纳米粒子表面,两种纳米粒子通过互补链的桥连作用形成复合物;当凝血酶存在时,互补链解螺旋可导致复合物解离;通过磁场分离,检测溶液中残留金纳米粒子产生的电化学信号。该方法简单、快速,具有良好的抗干扰性,在复杂样品中的检测限为 6.6×10^{-13} mol/L。

2 非标记型电化学适体生物传感器

非标记型电化学生物传感器中,适体不需要标记,直接根据适体分子识别前后的电流、电阻等电化学信号改变进行检测。与标记型相比,非标记型生物传感器成本低、操作简单,但灵敏度相对较低。

2.1 电化学阻抗适体传感器 电化学交流阻抗图谱(EIS)是非标记型生物传感器最常用的方法之一。电极表面固定的适体与目标分子识别后,导致电极表面的空间位阻改变,继而引起电化学交流阻抗图谱变化。Radi 等^[19]首次将 EIS 引入适体传感器,将凝血酶适体固定在金电极表面,溶液中的 Fe(CN) $^{63-/4-}$ 离子作为氧化还原探针。适体与凝血酶的结合引起电

子转移电阻的增加,界面电子转移电阻随着凝血酶浓度的提高相应增加,检测下限达 2.0 nmol/L。该传感器在 2.0 nmol/L 的 NaCl 中浸泡 10 min 后可获得再生,重复使用 15 次测定阻抗无明显变化。Li 等^[20]在金纳米粒子表面标记多条凝血酶适体链,采用夹心法检测凝血酶,检测限为 0.02 nmol/L。Kara 等^[21]将碳纳米管修饰在印刷电极表面构建了一种用于蛋白质检测的电化学阻抗传感器,碳纳米管不仅增大电极的比表面积,还有效增强电子传递效率,对凝血酶的检测限达 105 pmol/L。

然而,小分子与相应适体在电极表面的结合,引起的界面电子转移阻抗变化十分微弱,使得利用电化学阻抗谱检测小分子比较困难。为了克服这一难点,Zayats 等^[22]提出了一种基于 DNA 解螺旋的电化学阻抗传感器用于腺苷的检测,这种方法可以腺苷等小分子的定量分析。González-Fernández 等^[23]应用一种基于替代竞争原理的电化学阻抗传感器成功检测了人血清中的妥布霉素。在这些生物传感器中,EIS 信号不再直接来源目标分子,这些生物传感器的发明使 EIS 在适体生物传感器中的应用更加广泛。

2.2 其他类型的非标记型电化学适体生物传感器 [Ru(NH₃)₆]³⁺等阳离子具有氧化还原活性,可通过静电吸附在 DNA 链表面作为检测探针。Cheng 等^[24]报道了一种基于[Ru(NH₃)₆]³⁺静电吸附的无溶菌酶传感器,当带有正电荷的溶菌酶与适体结合时,[Ru(NH₃)₆]³⁺受到静电排斥而从适体表面脱落,利用循环伏安法可实现对凝血酶的检测。Wang 等^[25]应用相似的原理,在金纳米表面组装多条 PDGF-BB 适体,通过夹心法实现了 PDGF-BB 的检测。通过亚甲基蓝对鸟嘌呤的亲合作用将其嵌插在 DNA 和 tRNA 上,Bang 等^[26]以此为基础发展了一种灯塔结构的电化学适体传感器,亚甲基蓝嵌插在灯塔结构含有两对 G-C 的茎部产生较强的电化学信号;当凝血酶与适体结合时,发夹结构打开而释放亚甲基蓝,电化学信号相应减小,其检测限达 11 nmol/L。

3 小 结

与抗体相比,适体可通过体外合成,且其合成周期短、成本低;在结构可变性设计方面,其更具有抗体无法比拟的优势;在生物传感器方面,适体易于在各种纳米粒子上进行修饰,为传感器的研究提供了一种灵敏、快速、价廉的新途径,具有良好的发展前景。随着 SELEX 自动化的发展,相信电化学适体传感器将会在生命科学、环境科学等领域中发挥更加重要的作用。

参考文献

- [1] Hong P, Li W, Li J. Applications of aptasensors in clinical diagnostics[J]. *Sensors*(Basel), 2012, 12(2): 1181-1193.
- [2] Li D, Song S, Fan C. Target-responsive structural switching for nucleic acid-based sensors[J]. *Acc Chem Res*, 2010, 43(5): 631-641.
- [3] Syed MA, Pervaiz S. Advances in aptamers[J]. *Oligonucleotides*, 2010, 20(5): 215-224.
- [4] Ellington AD, Szotak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands[J]. *Nature*, 1990, 346(6287): 818-822.
- [5] Rowe W, Platt M, Day PJ. Advances and perspectives in aptamer arrays[J]. *Integr Biol*(Camb), 2009, 1(1): 53-58.
- [6] Bonel L, Vidal JC, Duato P, et al. An electrochemical competitive biosensor for ochratoxin A based on a DNA biotinylated aptamer

- [J]. *Biosens Bioelectron*, 2011, 26(7): 3254-3259.
- [7] Zhu Z, Schmidt T, Mahrous M, et al. Optimization of the structure-switching aptamer-based fluorescence polarization assay for the sensitive tyrosinamide sensing[J]. *Anal Chim Acta*, 2011, 707(1/2): 191-196.
- [8] Wang J, Munir A, Li Z, et al. Aptamer-Au NPs conjugates-enhanced SPR sensing for the ultrasensitive sandwich immunoassay[J]. *Biosens Bioelectron*, 2009, 25(1): 124-129.
- [9] Chen CK, Huang CC, Chang HT. Label-free colorimetric detection of picomolar thrombin in blood plasma using a gold nanoparticle-based assay[J]. *Biosens Bioelectron*, 2010, 25(8): 1922-1927.
- [10] Xiao Y, Lubin AA, Heeger AJ, et al. Label-free electronic detection of thrombin in blood serum by using an aptamer-based sensor[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2005, 44(34): 5456-5459.
- [11] Ferapontova EE, Olsen EM, Gothelf KV. An RNA aptamer-based electrochemical biosensor for detection of theophylline in serum[J]. *J Am Chem Soc*, 2008, 130(13): 4256-4258.
- [12] Liu Y, Tuleouva N, Ramanculov E, et al. Aptamer-based electrochemical biosensor for interferon gamma detection [J]. *Anal Chem*, 2010, 82(19): 8131-8136.
- [13] Xiao Y, Piorek BD, Plaxco KW, et al. A reagentless signal-on architecture for electronic, aptamer-based sensors via target-induced strand displacement[J]. *J Am Chem Soc*, 2005, 127(51): 17990-17991.
- [14] Liu X, Li Y, Zheng J, et al. Carbon nanotube-enhanced electrochemical aptasensor for the detection of thrombin[J]. *Talanta*, 2010, 81(4/5): 1619-1624.
- [15] Centi S, Tombelli S, Minunni M, et al. Aptamer-Based detection of plasma proteins by an electrochemical assay coupled to magnetic beads[J]. *Anal Chem*, 2007, 79(4): 1466-1473.
- [16] Willner I, Cheglakov Z, Weizmann Y, et al. Analysis of DNA and single-base mutations using magnetic particles for purification, amplification and DNAzyme detection[J]. *Analyst*, 2008, 133(7): 923-927.
- [17] Pelossof G, Tel-Vered R, Elbaz J, et al. Amplified biosensing using the horseradish peroxidase-mimicking DNAzyme as an electrocatalyst[J]. *Anal Chem*, 2010, 82(11): 4396-4402.
- [18] Zheng J, Cheng GF, He PG, et al. An aptamer-based assay for thrombin via structure switch based on gold nanoparticles and magnetic nanoparticles[J]. *Talanta*, 2010, 80(5): 1868-1872.
- [19] Radi AE, Acero Sánchez JL, Baldrich E, et al. Reusable impedimetric aptasensor[J]. *Anal Chem*, 2005, 77(19): 6320-6323.
- [20] Li B, Wang Y, Wei H, et al. Amplified electrochemical aptasensor taking AuNPs based sandwich sensing platform as a model[J]. *Biosens Bioelectron*, 2008, 23(7): 965-970.
- [21] Kara P, de la Escosura-Muniz A, Maltez-da Costa M, et al. Aptamers based electrochemical biosensor for protein detection using carbon nanotubes platforms[J]. *Biosens Bioelectron*, 2010, 26(4): 1715-1718.
- [22] Zayats M, Huang Y, Gill R, et al. Label-free and reagentless aptamer-based sensors for small molecules[J]. *J Am Chem Soc*, 2006, 128(42): 13666-13667.
- [23] González-Fernández E, de los Santos-Álvarez N, Lobo-Castanón MJ, et al. Impedimetric aptasensor for tobramycin detection in human serum[J]. *Biosens Bioelectron*, 2011, 26(5): 2354-2360.
- [24] Cheng AK, Ge B, Yu HZ. Aptamer-based biosensors for label-free voltammetric detection of lysozyme [J]. *Anal Chem*, 2007, 79

(14):5158-5164.

[25] Wang J, Meng W, Zheng X, et al. Combination of aptamer with gold nanoparticles for electrochemical signal amplification; application to sensitive detection of platelet-derived growth factor[J]. Biosens Bioelectron. 2009, 24(6): 1598-1602.

• 综 述 •

[26] Bang GS, Cho S, Kim BG. A novel electrochemical detection method for aptamer biosensors[J]. Biosens Bioelectron. 2005, 21(6): 863-870.

(收稿日期:2012-04-01)

热消融方法用于肿瘤细胞杀伤机制的研究进展

杨鹏飞¹综述, 刘宝林²审校

(1. 国家食品药品监督管理局医疗器械审评中心, 北京 100020;
2. 上海理工大学医疗器械与食品学院, 上海 200093)

关键词: 肿瘤; 热消融; 综述

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2012. 18. 025 文献标识码: A 文章编号: 1673-4130(2012)18-2224-03

热消融方法已被广泛地应用于治疗各种肿瘤疾病, 消融肿瘤的热能来源可以为射频、激光、微波以及超声波等。这些消融方法可以通过微创或是无创的方式对肿瘤组织进行治疗, 而同时可以避免对周围正常的组织产生损伤^[1-4]。尽管该法疗效显著, 但手术后仍发现有复发症^[5-6]。理解热消融方法对肿瘤治疗的潜在机制可以更好地控制手术过程, 减少复发症, 增加患者的存活率。

1 热疗法机制

肿瘤的热消融方法均以热为主要方式破坏肿瘤, 按照产生热和热传递的方式的不同, 主要分为射频消融^[7]、激光热消融^[8]、微波消融^[9]、超声波聚焦^[10]。而对组织的热消融可以分为直接热损伤效应和间接热损伤效应。

直接热消融效应与组织所受到的温度相关, 一般加热温度为 42~45 ℃, 时间为 30~60 min, 就可导致不可逆的细胞内的蛋白质(包括膜蛋白)变性^[11]。当组织温度升高到 60 ℃时, 细胞产生不可逆损伤的时间将大大缩短。在 60~140 ℃时, 蛋白质变性, 细胞片刻间死亡, 在这个温度范围内, 发现有凝固坏死区间^[12]。当温度继续升高到 100~300 ℃时, 组织内水分气化。在 300~1 000 ℃时, 会发生碳化以及产生烟的现象, 同时由于出现了热阻限制现象, 碳化阻碍了组织受损伤的程度^[13]。而且碳化增加了组织间隙压力, 可能会导致癌细胞扩散而深入肝脏及血管。

对肿瘤的热消融过程可以分为 4 个区域: 作用区域、中心区域、过渡区域和参考区域^[14]。作用区域是热源接触组织的地方。中心区域在作用区域外侧, 由被破坏的组织组成。过渡区域则由部分损伤细胞和部分未受损伤的细胞组成, 这部分组织有亚急性出血症状。参考区域指在过渡区域外的正常组织。热损伤后如果立即对作用区域的细胞进行评估时, 发现其形态上正常, 但采用电镜观测发现细胞已经受到不可逆的损伤。例如, 对肝进行微波加热试验时, 发现细胞形态学和组织学特征正常, 但新陈代谢功能已经丧失^[15]。在中心区发现细胞有酶活损失, 并最终死亡^[16]。

在热疗后肿瘤血管系统也会发生变化, 但血管系统对热的反应是有限的^[17]。当温度在 40~42 ℃, 时间在 30~60 min 时, 肿瘤血流并没有显著的变化^[18]。而正常的组织由于炎症反应, 血流量会轻微增加, 治疗后会回到基准水平^[19]。超过 42~44 ℃时, 肿瘤血流发生不可逆的减少, 出现血管郁积和血

栓, 导致热阻增大。当温度超过 60 ℃时, 肿瘤的微环境完全受到损伤^[20]。

由于温度突变而导致的机械效应也会对组织产生直接的损伤。在作用组织部位的相变或是热膨胀会导致冲击波。在组织界面产生的二次波会导致作用部位末梢组织的断裂^[21]。

肿瘤细胞以及亚细胞机构直接受热损伤的机制比较复杂, 与很多细胞机制相关。当温度在 50~55 ℃时, 细胞会很快死亡^[22]。而亚细胞结构, 包括核酸、细胞膜、细胞骨架以及线粒体都会收到热损伤^[23]。一般认为, 细胞膜功能的变化是加热导致细胞死亡的主要因素。温度升高后细胞膜流动性的改变、渗透特性的改变和表面气泡的产生都是这个观点的依据^[24]。而另一种观点认为, 膜的破坏并不是热消融导致细胞死亡的原因, 两者之间并没有直接的联系^[25]。线粒体功能的紊乱才是决定因素, 其超微结构确实与细胞的存活率以及新陈代谢功能相关^[23]。

与上同热疗对 DNA 的热效应主要体现在 DNA 长链的断裂程度上, 这直接反映出 DNA 能否正常复制^[24]。若癌细胞的 DNA 经过热疗后, 长链发生断裂现象, 将会对癌细胞的正常繁殖起到阻碍作用, 达到阻止癌细胞恶性化繁殖的目的, 对于治疗癌症起到积极的作用。直接热消融后组织仍然会受到间接的损伤, 临床以及试验数据显示热消融停止后组织的损伤仍将继续^[25], 但此类损伤的机制仍有待研究。可能代表细胞损伤死亡的延迟, 或者是由于最开始的热刺激而触发了细胞损伤的扩充或展开^[1]。研究发现, 在肝转移模型中, 应用热疗后肿瘤细胞受损伤的峰值出现在 4~5 d 后。通过 NADA-diaphorase 染色, 发现间接的损伤与最初的热效应并不相关^[26]。间接损伤机制还可能与众多因素包括细胞的凋亡、巨噬细胞、细胞因子的释放以及缺血灌注损伤等相关。

人体免疫系统与热消融也有着一定的关系。热疗会改变免疫抗原, 而产生很多免疫反应。而免疫反应可能是热消融后对肿瘤继续损伤且影响肿瘤复发性的机制之一^[27]。不同的细胞免疫性能不相同, 人的肝癌细胞有较低的产生免疫原的能力。一些研究者研究了热消融与免疫效应对癌细胞的共同作用情况^[28], 很可能由于热消融而增加了癌细胞抗原的表达, 刺激了免疫反应。

2 射频消融热疗

通常将无线电频率称为射频, 射频治疗是利用频率较高的