

适配子及其临床诊断的应用进展

陈 栋 综述, 黄 庆, 黄君富, 府伟灵[△] 审校

(第三军医大学西南医院检验科, 重庆市 400038)

关键词: 适配子, 核苷; 生物传感技术; 诊断; SELEX 技术

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2011.04.017

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)04-0468-03

1990 年, 2 名科学家采用体外筛选与 PCR 相结合的新技术从人工构建的寡核苷酸文库中分别筛选到了与有机染料和噬菌体 DNA 聚合酶特异性结合的寡核苷酸序列^[1-2]。这种新技术后来被命名为指数富集配体系统进化技术(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX), 筛选到的寡核苷酸被命名为适配子(aptamer)。适配子是人工合成的单链寡核苷酸(DNA 或 RNA), 能够与靶物质进行高特异性与亲和性地结合, 其功能类似抗体, 但比抗体具有更多的优势, 因此颇受学者们的青睐。近年来, 随着适配子研究的深入, 其筛选及修饰技术不断得到优化, 在生物医学方面的应用领域越来越广, 特别是以其为识别分子的生物传感器为各种物质更高灵敏度的检测提供了可能性。本文对适配子近年来筛选技术、靶物质的筛选进展以及其在临床诊断中的应用情况作一综述并进行展望。

1 适配子的筛选技术

1.1 SELEX 技术的原理 SELEX 技术是将体外筛选与 PCR 相结合的一项新的技术。它的原理是首先在体外人工构建一个寡核苷酸文库, 文库中的寡核苷酸两端是固定序列, 中间是随机序列, 文库大小一般为 $10^{14} \sim 10^{15}$ 。然后将文库中的寡核苷酸与靶物质进行孵育结合, 从而形成适配子与靶物质的复合物。将此复合物与未结合的寡核苷酸分离, 之后洗脱复合物中结合的寡核苷酸, 并以后者作为模板进行 PCR 扩增, 从而得到靶物质的适配子比例较高的新文库, 以备进入下一轮适配子筛选之用。一般经过 8~15 次筛选, 即可获取靶物质对应的高特异性与亲和性的适配子, 然后将其进行克隆测序鉴定之后便可用于生物医学方面的研究^[3]。

1.2 SELEX 技术的改进 随着对适配子筛选技术研究的不断深入, 传统的 SELEX 技术逐渐暴露出一些缺点, 如筛选过程时间长、靶位点特异性不强等。为此科学家在传统的 SELEX 技术的基础上对其进行了改进, 目前能够满足不同需求的 SELEX 技术已经相继亮相。基于核酸适配子修饰的光敏 SELEX(photo SELEX) 技术及混合 SELEX(blended SELEX) 技术能够对蛋白质与肽段的适配子进行高特异性地筛选, 而且产生率都很高, 但不足之处在于这 2 种技术只是针对具有活性反应位点的大分子设计的。定制 SELEX(tailored SELEX) 技术能够高效地筛选出蛋白质、肽段及小分子物质的适配子, 而且特异性较高, 但是其适用范围有限。还有毛细管电泳 SELEX(capillary electrophoresis SELEX) 技术能够经过几个循环的筛选, 即可以得到高亲和性与特异性的适配子, 大大缩减了筛选所用的时间, 但是限于电泳技术的原理, 此项技术同样不适用于小分子物质适配子的筛选^[4]。另外, 还有自动化的 SELEX 技术的报道^[5], 这种技术可以将时间大大缩短, 目前这

种技术已经能够成功地筛选出 CYT-8、MEK1 及 Rho 蛋白质的适配子。此外还有如复合靶 SELEX(complex targets SELEX) 技术、消减 SELEX(subtractive SELEX) 技术等。

2 适配子的筛选进展

适配子能否广泛应用于临床的检测, 最终取决于已经筛选到的靶物质的适配子。截至 2006 年, Aptamer Database^[6] 公布已经筛选到适配子的靶物质数量达到 239 个, 其中大致可分为有机物、无机物、核酸、肽段、蛋白质以及其他等, 每种物质筛选的适配子个数不一, 性质也不一样, 但大多数为核酸 RNA, 少数为 DNA。近年来随着 SELEX 技术的发展, 临床检测需求的增加, 广大学者开始致力于病毒、细菌、肿瘤细胞及标志物等方面的筛选, 并且取得了相应的进展。目前已经筛选到的适配子相关病毒包括乙肝病毒表面抗原、丙肝的非结构蛋白酶和核心抗原、HIV 病毒核壳蛋白、冠状病毒的解旋酶、人类流感病毒血凝素以及牛痘病毒等^[7-9]。涉及到的细菌包括结核杆菌、乳酸菌酸性细胞以及空肠弯曲菌等。随着适配子筛选技术的不断提高, 目前, 愈来愈多的学者们逐渐将目光聚集在肿瘤标志物以及肿瘤细胞适配子的筛选上^[10-13]。

3 适配子的优缺点

适配子在生物研究领域具有巨大的潜力, 得益于其自身的许多优势, 包括如下几个方面: (1) 靶分子范围广。可以从金属离子等小分子到蛋白质这样的大分子乃至整个细胞。(2) 高特异性与亲和性。适配子能够识别出靶分子结构上如甲基与羟基这样的细微区别, 且与靶分子结合后的解离常数处于纳摩尔和皮摩尔水平。(3) 体外筛选, 易人工合成。可以通过 SELEX 技术的自动化进行大批量低成本生产, 且批间差异较小, 同时也能针对毒素及免疫原性较弱的物质进行筛选。(4) 稳定性好。对温度及 pH 不敏感, 易于保存与运输。(5) 易修饰, 便于标记。可以在适配子寡核苷酸的精确位点进行修饰, 增强其稳定性, 同时能够连接各种标记分子与药物, 进行临床诊治。(7) 分子小, 空间位阻小。可以与靶分子高效绑定, 也易实现细胞内药物运送与治疗。尽管适配子与抗体相比具有几乎完美的特性, 但还存在一些不足之处, 如: RNA 适配子在体外容易被核酸酶降解, 小分子物质的适配子不易筛选等等。现在学者已经能够运用一些技术手段克服核酸酶降解的问题了, 至于小分子物质适配子的广泛筛选, 有待进一步研究。

4 适配子型生物传感器

4.1 电化学生物传感器 电化学生物传感器(electrochemical biosensor) 是用电极作为换能元件, 将分子生化反应的变化转变为电阻、电流及电势等信号输出, 从而实现待测物质的检测。目前以适配子作为识别分子的电化学传感器的报道不断增多。Xu 等^[14] 报道了一种电化学阻抗光谱法(electrochemical im-

[△] 通讯作者, E-mail: weilingfu@yahoo.com.

pedance spectroscopy)用于人类免疫球蛋白 IgE 的检测。在这个过程中他们用适配子修饰的阵列电极对 IgE 进行了免标记检测,同时将这种方式的检测结果与 IgE 抗体为识别分子的检测结果进行了对比,发现在特异性与敏感性方面都具有相当的优势,其线性范围为 2.5~100 nmol/L,检测限达到了 0.1 nmol/L。Liu 等^[15]研制了一种电流作为输出信号的适配子型电化学传感器对腺苷进行了高敏感性与特异性地检测,这种传感器是可重复利用的。此外还有通过适配与靶物质反应导致电势的改变进而对物质进行检测的报道^[16]。

4.2 光学生物传感器 以适配子为识别分子的光学生物传感器(optical biosensor)是将适配子与靶物质结合后产生的变化转变为光学信号,通过后者的参数变化对靶物质含量进行测定。光学传感器的检测模式较多,包括:吸收、反射、荧光、化学发光和磷光以及表面等离子体共振(Surface plasmon resonance, SPR)等。目前以适配子为识别分子的表面等离子体共振传感器是研究较多的一种, Ostatna 等^[17]开发了一种多通道 SPR 传感器,对凝血酶适配子固定于传感器表面的 3 种方法进行了探索性研究,发现抗生蛋白链菌素-生物素固定法在靶物质检测的灵敏性与特异性上都是最好的。2007 年 Wang 等^[18]利用 IgE 适配子修饰的 SPR 传感器对 IgE 进行了检测,最低检测浓度为 2 nmol/L。与上述电化学检测方法比较,敏感性稍逊于电化学法,但与抗体检测法比较还是很高的。Rajendran 等^[19]报道了适配子用于分子信标的研究,他们通过荧光的猝灭巧妙地金属离子进行了检测,这项研究可用于环境中各种金属离子含量的测定。

4.3 压电生物传感器 压电生物传感器(piezoelectric quartz crystal biosensor)是一种简单、无需标记而且响应速度较快的传感器。适配子具有很好的特异性结合,将适配子用于这种传感器可进一步增强其检测效能。2009 年 Yao 等^[20]研制了一种适配子与石英微量天平相结合用于人血清中 IgE 敏感性检测的生物传感器。他们将适配子固定在石英晶体表面的金膜上,只要血清中的 IgE 与适配子发生反应,石英微量天平的频移就会发生变化。此项研究发现这种传感器能够在 15 分钟内对血清中的 IgE 含量进行高敏感性与特异性的检测。实验证明适配子修饰的金膜可以重复使用多次且敏感性不会下降。目前适配子用于压电传感器的报道还不是很多,且多限于 IgE 的检测。

4.4 纳米生物传感器 纳米材料具有与宏观物质不同的优良特性。随着对纳米研究的深入,学者们发现适配子修饰的纳米材料更适用于生物学的研究,尤其是疾病的诊断方面。近年来,这方面的报道不断增多,不过多数集中于荧光法检测与色度法检测这两方面。2005 年 Levy^[21]首次报道了适配子修饰的量子点对凝血酶的检测,其检测原理主要是基于量子点的荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)。Liu 等^[22]研究了适配子修饰的量子点与金纳米颗粒对腺苷与可卡因的联合检测,取得了预期的效果。Wernette 等^[23]还发现将荧光标记的适配子固定在固体表面进行的检测比液体中具有更多的优点,如背景信号低、可重复利用、可长期保存及实时监测等。目前随着肿瘤细胞适配子的筛选,开始将其用于肿瘤细胞的识别检测。适配子修饰的量子点这种检测法效能较高,但是必须依靠相应的仪器才能进行,达不到方便易行的效果。为此,部分学者将适配子用于色度法检测的研究。2006 年 Liu 等^[24]报道了适配子的色度法用于腺苷与可卡因的检测,这种方法快速简单,不到一分钟就可以看到结果。

Wang 等^[25]通过此方法的点阵列超敏感的检测了凝血酶蛋白,检测限达到了 14 fmol/L。

5 展 望

目前适配子的筛选、特性及应用方面的研究已经取得了显著的成绩。随着 SELEX 技术的不断发展与完善,各种可用于临床检测的适配子将会越来越多地被筛选出来。这些能够与靶物质进行高特异性与亲和性结合的寡核酸物质以其良好的生物学特性会更广泛地用于临床疾病的诊治中。尤其是肿瘤早期诊断方面,适配子与新兴的纳米技术相结合会产生出巨大的效应,其临床应用前景是非常广阔的。

参考文献

- [1] Ellington AD, Szostak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands[J]. Nature, 1990, 346(30): 818-822.
- [2] Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase [J]. Science, 1990, 249(4968): 505-510.
- [3] 姚春燕, 府伟灵. 适配子技术在生物传感器中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(8): 707-712.
- [4] Tang JJ, Xie JW, Shao NS, et al. The DNA aptamers that specifically recognize ricin toxin are selected by two in vitro selection methods[J]. Electrophoresis, 2006, 27(7): 1303-1311.
- [5] Wochner A, Cech B, Menger M, et al. Semi-automated selection of DNA aptamers using magnetic particle handling [J]. Biotechniques, 2007, 43(3): 344-353.
- [6] <http://aptamer.icmb.utexas.edu/>.
- [7] Qin LH, Ma ZZ, Zheng RJ, et al. Selecting and affinity analysis of DNA aptamers to MPT64 protein from Mycobacterium tuberculosis[J]. Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi, 2008, 31(6): 453-458.
- [8] Hamula CLA, Zhang H, Guan LL, et al. Selection of Aptamers against Live Bacterial Cells [J]. Analytical Chemistry, 2008, 80(20): 7812-7819.
- [9] Dwivedi HP, Smiley RD, Jaykus LA. Selection and characterization of DNA aptamers with binding selectivity to Campylobacter jejuni using whole-cell SELEX [J]. App Microbiol Biotechnol, 2010, 87(6): 2323-2334.
- [10] Wang L, Liu B, Yin H, et al. Selection of DNA aptamer that specific binding human carcinoembryonic antigen in vitro [J]. Journal of Nanjing Medical University, 2007, 21(5): 277-281.
- [11] McCauley TG, Hamaguchi N, Stanton M. Aptamer-based biosensor arrays for detection and quantification of biological macromolecules [J]. Anal Biochem, 2003, 319(2): 244-250.
- [12] Jeong S, Han SR, Lee YJ, et al. Selection of RNA aptamers specific to active prostate-specific antigen [J]. Biotechnol Lett, 2010, 32(3): 379-385.
- [13] Zhao Z, Xu L, Shi X, et al. Recognition of subtype non-small cell lung cancer by DNA aptamers selected from living cells [J]. Analyst, 2009, 134(9): 1808-1814.
- [14] Xu D, Yu X, Liu Z, et al. Label-free electrochemical detection for aptamer-based array electrodes [J]. Anal Chem, 2005, 77(16): 5107-5113.
- [15] Liu ZY, Yuan R, Chai YQ, et al. Highly sensitive, reusable electrochemical aptasensor for adenosine [J]. Electrochimica Acta, 2009, 54(26): 6207-6211.
- [16] Du Y, Chen CG, Yin JY, et al. Solid-state probe based electrochemical aptasensor for cocaine: a potentially convenient, sensitive, repeatable, and integrated sensing platform for drugs [J]. A-

nal Chem, 2010, 82(4): 1556-1563.

- [17] Ostatna V, Vaisocherova H, Homola J, et al. Effect of the immobilisation of DNA aptamers on the detection of thrombin by means of surface plasmon resonance[J]. Anal Bioanal Chem, 2008, 391(5): 1861-1869.
- [18] Wang Z, Wilkop T, Xu D, et al. Surface plasmon resonance imaging for affinity analysis of aptamer-protein interactions with PDMS microfluidic chips[J]. Anal Bioanal Chem, 2007, 389(3): 819-825.
- [19] Rajendran M, Ellington AD. Selection of fluorescent aptamer beacons that light up in the presence of zinc[J]. Anal Bioanal Chem, 2008, 390(4): 1067-1075.
- [20] Yao C, Qi Y, Zhao Y, et al. Aptamer-based piezoelectric quartz crystal microbalance biosensor array for the quantification of IgE[J]. Biosens Bioelectron, 2009, 24(8): 2499-2503.
- [21] Levy M, Cater SF, Ellington AD. Quantum-dot aptamer beacons

for the detection of proteins[J]. ChemBiochem, 2005, 6(12): 2163-2166.

- [22] Liu J, Lee JH, Lu Y. Quantum dot encoding of aptamer-linked nanostructures for one-pot simultaneous detection of multiple analytes[J]. Anal Chem, 2007, 79(11): 4120-4125.
- [23] Wernet DP, Liu JW, Bohn PW, et al. Functional-DNA-Based nanoscale materials and devices for sensing trace contaminants in water[J]. MRS Bull, 2008, 33(1): 34-41.
- [24] Liu JW, Lu Y. Fast colorimetric sensing of adenosine and cocaine based on a general sensor design involving aptamers and nanoparticles[J]. Angew Chem Int Edit, 2006, 45(1): 90-94.
- [25] Wang YL, Li D, Ren W, et al. Ultrasensitive colorimetric detection of protein by aptamer-Au nanoparticles conjugates based on a dot-blot assay[J]. Chem Commun, 2008, (22): 2520-2522.

(收稿日期: 2010-05-10)

• 综 述 •

MALDI-IMS 直接组织分析

黄礼玲¹, 邹同祥², 眭维国¹, 陈洁晶, 吴润强, 费桂英 综述, 戴 勇[△] 审校

(1. 中国人民解放军第 181 医院, 广西桂林 541002; 2. 广西师范大学生命科学学院, 广西桂林 541004)

关键词: 光谱法, 质量, 基质辅助激光解吸电离; 组织; 病理学; 原位蛋白组学

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2011. 04. 018

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)04-0470-03

在生物医学研究中, 新的生物标志物的发现和新药物的研发, 需要灵敏、高通量、全面、快速的分析技术。利用基质辅助激光解吸电离成像质谱(matrix-assisted laser desorption ionization imaging mass spectrometry, MALDI-IMS) 技术, 直接分析生物组织切片, 对组织中化合物的组成、相对丰度及分布情况进行高通量、全面、快速的分析, 通过所获得的目标物质的分布信息, 发现生物标志物和监控化合物, 该技术可用于组织病理特征观察、疾病诊断、药物疗效监测以及生物标志物发现等。

1 组织切片蛋白的原位分析

使用成像质谱仪, 必要的组成部分包括自动光栅元件、自动数据获取系统和可视化软件。近来, 几乎所有的厂家都发展了与其仪器相关的内部软件, 并为这些仪器和图像重建系统装置了驱动程序。根据样本切片产生的离子的不同, 质谱成像仪可分为几类: 一类是通过脉冲激光照射, 一类是通过高能粒子的粒子辐射。以激光为基础的系统包括 MALDI 和激光解吸附离子化仪器。二次离子质谱(secondary ion mass spectrometry, SIMS) 系统通过连续的高度集中的高能粒子束攻击。一般来说, 这些成像仪器大部分利用 MALDI-飞行时间(MALDI-time of flight, MALDI-TOF)、MALDI-TOF/TOF 和 TOF-SIMS。MALDI-TOF 成像仪器具有高通量的特点, TOF-SIMS 成像仪器能提供亚微米的空间分辨率^[1]。这 2 个成像仪器在质谱成像方面都具有强有力的优点。本综述主要讨论 MALDI-IMS。

2 组织样本采集和制备

在整个样本采集、制备、质谱成像和最后的解释等过程中, 都要保持样本的化学代表性和空间完整性^[2]。避免在样本制

备过程中造成被分析化合物的降解和空间移位, 防止冰晶形成; 避免切片打卷、起皱褶, 选择适宜的切片厚度等。冷冻的组织在恒温冷冻切片机上进行切割, 切割平台的温度根据组织类型保持在 -5~-25 °C 之间。切片厚度一般在 10~20 μm, 以保证质谱分析时被分析物足够的组分浓度^[3]。

3 切片的 MALDI 的基质应用

大量的被分析物所选用的不同分子大小基质都凭经验来选择。对于组织分析, 常用的基质芥子酸(SA)、α-氰基-4-羟基肉桂酸(HCCA) 和 2,5-二羟基苯甲酸(DHB)。SA 能为高分子量的蛋白提供最好的信号, HCCA 则主要应用于多肽和低分子量蛋白, DHB 则适用于小分子药物的信号获取。基质覆盖通常有两种方法: 斑点法和喷雾法。喷雾法是在可控条件下振荡蒸发产生基质微粒, 然后轻柔的覆盖于组织样品之上。在此过程中, 尽可能满足以下条件: 组织切片上的被分析物无扩散或移位; 质谱成像的分辨率必须应大于共结晶的尺寸; 基质与被分析物形成良好的共结晶。基质浓度主要影响结晶的覆盖率。通常 SA 的浓度以 10~30 mg/mL 为宜。将喷好基质的组织切片放在室温下, 待溶剂挥发析出结晶后放入干燥器中干燥 2 h。

4 切片组织学染色和 MALDI-IMS

先进的 MALDI-IMS 软件可以在进行 MALDI 操作之前, 完成 MALDI 图像和宏观或显微光学图像的叠加。

为正确解释 MALDI-IMS 结果, 必须联系切片组织学信息。相邻的 2 张切片中, 取 1 张用于苏木精-伊红(HE) 染色, 因为这种染色方法可以获得更多的组织学信息, 如可以将切片中巨大的侵入性肿瘤区与大区域的结缔组织区组织特征显著的区别开来。并为后续的解释提供一定的分子信息。近来, 报

△ 通讯作者, E-mail: daiyong22@yahoo. com. cn。