

- single-gene methylation to methylome profiling[J]. Cancer Metastasis Rev, 2010, 29(1): 95-107.
- [2] Balaña C, Carrato C, Ramírez JL, et al. Tumour and serum MGMT promoter methylation and protein expression in glioblastoma patients[J]. Clin Transl Oncol, 2011, 13(9): 677-685.
- [3] Tan SH, Ida H, Lau QC, et al. Detection of promoter hypermethylation in serum samples of cancer patients by methylation-specific polymerase chain reaction for tumour suppressor genes including RUNX3[J]. Oncol Rep, 2007, 18(5): 1225-1230.
- [4] Heller G, Ziegler B, Brandstetter A, et al. CDK10 is not a target for aberrant DNA methylation in breast cancer[J]. Anticancer Res, 2009, 29(10): 3939-3944.
- [5] Suijkerbuijk KP, Pan X, van der Wall E, et al. Comparison of different promoter methylation assays in breast cancer[J]. Anal Cell Pathol (Amst), 2010, 33(3): 133-141.
- [6] Malpeli G, Amato E, Dandrea M, et al. Methylation-associated down-regulation of RASSF1A and up-regulation of RASSF1C in pancreatic endocrine tumors[J]. BMC Cancer, 2011, 11(1): 351.
- [7] Wu W, Zhang J, Yang H, et al. Examination of AKAP12 promoter methylation in skin Cancer using methylation-sensitive high-resolution melting analysis[J]. Clin Exp Dermatol, 2011, 36(4): 381-385.
- [8] Kristensen LS, Wojdacz TK, Thestrup BB, et al. Quality assessment of DNA derived from up to 30 years old formalin fixed paraffin embedded(FFPE) tissue for PCR-based methylation analysis using SMART-MSP and MS-HRM[J], 2009, 9(1): 453.
- [9] Candiloro IL, Mikeska T, Dobrovic A. Assessing combined methylation-sensitive high resolution melting and pyrosequencing for the analysis of heterogeneous DNA methylation [J]. Epigenetics, 2011, 6(4): 500-507.
- [10] Dahl C, Guldberg P. DNA methylation analysis techniques[J]. Biogerontology, 2003, 4(4): 233-250.
- [11] Lim EH, Ng SL, Li JL, et al. Cervical dysplasia: assessing methylation status(Methy Light) of CCNA1, DAPK1, HS3ST2, PAX1 and TFP12 to improve diagnostic accuracy[J]. Gynecol Oncol, 2010, 119(2): 225-231.
- [12] He Q, Chen HY, Bai EQ, et al. Development of a multiplex MethyLight assay for the detection of multigene methylation in human colorectal cancer[J]. Cancer Genet Cytogenet, 2010, 202(1): 1-10.
- [13] Dallol A, Al-Ali W, Al-Shaibani A, et al. Analysis of DNA methylation in FFPE tissues using the MethyLight technology[J]. Methods Mol Biol, 2011, 724(1): 191-204.
- [14] Zhou J, Cao J, Lu Z, et al. A 115-bp MethyLight assay for detection of p16(CDKN2A) methylation as a diagnostic biomarker in human tissues [J]. BMC Med Genet, 2011, 12(1): 67.
- [15] Brenna RM, Huang TH, Plass C. Quantitative assessment of DNA methylation: Potential applications for disease diagnosis, classification, and prognosis in clinical settings[J]. J Mol Med, 2006, 84(5): 365-377.
- [16] Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, et al. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(8): E32.
- [17] Shaw RJ, Liloglou T, Rogers SN, et al. Promoter methylation of P16, RARbeta, E-cadherin, cyclin A1 and cytoglobin in oral Cancer: quantitative evaluation using pyrosequencing[J]. Br J Cancer, 2006, 94(4): 561-568.
- [18] Brakensiek K, Wingen LU, Langer F, et al. Quantitative high-resolution CpG island mapping with Pyrosequencing reveals disease-specific methylation patterns of the CDKN2B gene in myelodysplastic syndrome and myeloid leukemia[J]. Clin Chem, 2007, 53(1): 17-23.
- [19] Marsit CJ, Koestler DC, Christensen BC, et al. DNA methylation array analysis identifies profiles of blood-derived DNA methylation associated with bladder cancer[J]. J Clin Oncol, 2011, 29(9): 1133-1139.
- [20] Hayashi H, Nagae G, Tsutsumi S, et al. High-resolution mapping of DNA methylation in human genome using oligonucleotide tiling array[J]. Hum Genet, 2007, 120(5): 701-711.
- [21] Ching TT, Maunakea AK, Jun P, et al. Epigenome analyses using BAC microarrays identify evolutionary conservation of tissue-specific methylation of SHANK3[J]. Nat Genet, 2005, 37(6): 645-651.
- [22] Arai E, Wakai-Ushijima S, Fujimoto H, et al. Genome-wide DNA methylation profiles in renal tumors of various histological subtypes and non-tumorous renal tissues[J]. Pathobiology, 2011, 78(1): 1-9.
- [23] Arai E, Ushijima S, Gotoh M, et al. Genome-wide DNA methylation profiles in liver tissue at the precancerous stage and in hepatocellular carcinoma[J]. Int J Cancer, 2009, 125(12): 2854-2862.
- [24] Eckhardt F, Lewin J, Cortese R, et al. DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22[J]. Nat Genet, 2006, 38(12): 1378-1385.
- [25] 付文荣, 程正江. SYBR Green I 实时荧光 PCR 检测 survivin 甲基化状态[J]. 国际检验医学杂志, 2008, 29(11): 992-994, 997.

(收稿日期: 2012-10-09)

## · 综述 ·

## 适体在均相检测中的应用

马洪玉 综述, 兰小鹏 审校

(南京军区福州总医院检验科, 福建福州 350025)

关键词: 适体; 均相检测; 综述

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.06.027

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2013)06-0693-05

核酸适体是通过指数式富集法配体进化(SELEX)技术从人工合成的DNA或RNA随机库中筛选出来的,能够与目标分子进行高亲和性和高特异性结合的寡核苷酸序列<sup>[1-2]</sup>。适

体,经常被称作"合成抗体",可以在疾病的诊断和治疗方面与抗体相媲美:适体与靶物质结合具有很高的亲和力,解离常数可达nmol,甚至pmol水平,有时甚至优于抗体;适体的靶分子

广泛,包括蛋白质、多糖、金属离子、核酸或病原微生物,理论上,适体可以从任何靶分子得到,包括毒性和非免疫原性复合物;而且适体稳定性强,易于被各种化学标记物修饰,可广泛应用于生物技术不同领域,包括基础研究、药物的研发和纯化过程、临床诊断等<sup>[3]</sup>。适体可以固定或不固定的配体方式分别用于非均相或均相检测中。大多数传统的诊断方法建立在配体或受体固定的基础上。这些检测方法费时费力,操作繁杂,不适于自动化分析。最近国内外学者相继建立均相检测方法,简单,易实行,快速并且可自动化。本文对适体在均相检测中的应用进行综述。

## 1 比色法检测

比色法是最简单的传感方法,在基于适体的检测中占有重要地位,检测信号可以通过肉眼观察颜色变化而直接读出。检测可建立在纳米金粒子凝集反应、染料取代反应或与阳离子聚合物的反应的基础上。

**1.1 阳离子聚噻吩** 水溶性的阳离子聚噻吩可以用作“聚合染料”,特异性地将适体和靶物质的结合转换为光信号。聚 3-烷氧基-4-甲基噻吩已用于比色法检测凝血酶<sup>[4]</sup>。在没有靶物质存在时,展开的阴离子适体结合阳离子聚噻吩衍生物,显示红色。在靶物质存在时,适体形成四联体结构,阳离子聚合物包裹着折叠结构,显示橘色。这种比色法检测凝血酶的检测限是  $10^{-7}$  mol/L。这种方法建立在阳离子聚噻吩衍生物和阴离子单链寡核苷酸之间的静电反应和构型结构变化的基础上,不需要对适体或靶物质进行化学修饰,简单、快速、敏感并且特异。

**1.2 生色团** 有学者报道一种基于染料取代反应的比色检测。这种方法使用二乙基硫代三碳菁作为染料,用于可卡因的检测<sup>[5]</sup>。染料和针对可卡因的适体结合,可卡因的加入将染料置换到溶液中,立即引起吸光度的减弱并最终导致染料沉淀。加入可卡因的代谢产物如苯酰牙子碱,适体-染料复合物的可见光光谱未发生改变,说明此方法具有高度特异性。

**1.3 金纳米粒子** 金纳米粒子得到广泛应用主要是因为它们的生物功能、生物稳定性和光谱特性。由于等离子共振,AuNPs 具有强的距离依赖的光学特性。一旦分散的 AuNPs 聚集,其 SPR 红色峰值从 520 nm 转到 650 nm,颜色表现为可见的改变,从红色变为紫色,甚至蓝色<sup>[6]</sup>。根据这个原理,有学者报道几种使用适体功能化的 AuNPs<sup>[7-8]</sup>或未修饰的 AuNPs 均相检测法<sup>[9]</sup>。

有学者报道了基于分析物诱导 AuNPs 聚合物分解的方法。该方法检测腺苷的浓度范围是  $3 \times 10^{-4} \sim 2 \times 10^{-3}$  mol/L。检测可卡因的浓度范围为  $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^{-4}$  mol/L<sup>[9]</sup>。反之,有人利用分析物诱导的 AuNPs 聚集的方法检测血小板衍生的生长因子(PDGF)和血小板衍生的生长因子受体(PDGFR)<sup>[8]</sup>。使用以对 PDGF 特异的适体修饰的 AuNPs。在有靶物质存在时,适体-AuNP 溶液颜色改变。颜色从红色变为紫色。Green 等<sup>[10]</sup>建立了竞争结合反应的方法来检测 PDGFR $\beta$ 。适体可以抑制 PDGF 与 PDGFR 的结合,检测限估计为  $3.2 \times 10^{-9}$  mol/L,这种竞争方法检测的上限为  $2 \times 10^{-7}$  mol/L。

有研究者介绍了一种新的使用适体、适体的互补寡核苷酸和未修饰 AuNPs 建立的取代反应的方法<sup>[11]</sup>。首先,核酸适体和它的互补 DNA 形成双链。无 ATP 时,AuNPs 不稳定,在一定的盐浓度条件下呈聚集状态(蓝色);而在 ATP 存在时,适体与 ATP 结合后释放出的游离的单链 DNA 能稳定 AuNPs,可以抵抗盐键诱导的聚集(红色)。紫外目视分光镜检查 ATP 的

线性范围为  $4.4 \times 10^{-6} \sim 1.33 \times 10^{-4}$  mol/L, 检测限为  $6 \times 10^{-7}$  mol/L。这种方法同样适用于检测 K<sup>+</sup>或可卡因<sup>[9]</sup>。

## 2 荧光检测

荧光法是检测分子作用的敏感方法,也是基于适体的均相检测中提到的主要的检测方法。适体本身无荧光,需以外来荧光基团修饰,以将适体转变为荧光信号指示器<sup>[11]</sup>。检测建立在分子识别单元与靶物质反应时,荧光性质发生变化的基础上<sup>[12]</sup>。

**2.1 单标记适体** 可以直接化学标记或通过分子信标技术产生荧光标记适体,检测靶物质配体时可显示特异的信号。基于荧光基团信号适体设计策略是黏附单一的荧光基团在适体的不同位置。靶物质和适体结合,引起结构重组,改变了黏附的荧光基团的光谱性质<sup>[13]</sup>。设计抗 ATP 信号适体(RNA 或 DNA),带有一个荧光基团(吖啶或荧光素)、黏附在离靶物质结合位点较远位置。加入 1 mmol/L 的 ATP 后,荧光强度增加 25%~45%。

Huang 等<sup>[14]</sup>将荧光分子 N,N-二甲基-2,7-重氮芘(DM-DAP)插入核酸适体中,由于金纳米颗粒的猝灭作用,荧光染料不发出荧光;加入的 PDGF 与核酸适体特异性结合并释放出荧光染料,可测到 Turn-on 型荧光信号大强度的增高(可达 40 倍),检测限可达  $8 \times 10^{-12}$  mol/L。

适体覆盖的纳米晶体量子点已用于检测凝血酶<sup>[15]</sup>。当适体功能化的量子点与靶物质结合,位于蛋白上的功能团和量子点上的电荷转移,可以观察到一个高特异性的猝灭。光子激发光的光谱,在 1 050 nm 附近有个特征性的峰值,并随着凝血酶的浓度增加而下降。检测限是  $10^{-9}$  mol/L。最近,有人报道检测苏云金杆菌孢子的方法,适体-量子点结合物结合苏云金杆菌孢子后,可以观察到荧光<sup>[16]</sup>,在  $10^{-3} \sim 10^{-6}$  CFU/mL 范围内,荧光强度随着浓度而变化。

适体与配体结合后,结构发生强烈的改变。使用的两个适体分别识别蛋白的两个不同的抗原决定簇。包含荧光基团或猝灭剂的短互补寡核苷酸与适体连接。凝血酶存在时,适体结合到蛋白,导致发信号的两个寡核苷酸的荧光基团和猝灭剂接近,引起荧光信号的下降<sup>[17]</sup>。这种方法对凝血酶具有高选择性,即使在复杂的混合物中,低至纳米浓度的靶物质也可以检测到。

**2.2 双标记的适体** 有些 DNA 或 RNA 适体在 5' 和 3' 两端均被标记。FRET 技术常用于检测特殊靶物质<sup>[18]</sup>。Turn-on 型和低敏感的 Turn-off 型荧光检测见于报道。

等通过在 5' 端加入与 3' 端互补的核苷酸,将凝血酶结合的适体设计成适体信标,在靶物质存在时,适体从猝灭 Turn-off 状态结构改变为荧光 Turn-on 状态结构<sup>[19]</sup>。这种方法也适用于量子点适体信标<sup>[20]</sup>。生物素(酰)化的凝血酶结合适体与猝灭剂标记的互补寡核苷酸杂交,结合于量子点-抗生物素蛋白链菌素轭合物上。靶物质可取代猝灭剂标记的寡核苷酸,从而量子点的荧光强度增加。Tang 等<sup>[21]</sup>使用这种原理开发“适体转换探针”来检测 ATP 或凝血酶。探针由三种元件组成:适体(对 ATP 或凝血酶特异),与适体部分互补的短的 DNA 序列,连接这两种元件的交联剂。荧光基团和一个猝灭剂共价结合在互补 DNA 序列的两端。在加入 ATP(3.5 mmol/L)或凝血酶( $3 \times 10^{-7}$  mol/L)后,荧光可各自增强 30 或 18 倍。

Tang 等<sup>[21]</sup>团队描述的 Turn-off 荧光检测方法是基于分子适体信标(MAB)的三级折叠将适体链的两个末端紧密靠近。MAB 在无靶物质的溶液中呈自由卷曲构象。然而,在靶

物质存在时,适体呈包括两个 G-四联体的四重结构。在 15-mer 凝血酶结合适体的两端连接 6-FAM 染料和 DABCYL 猝灭剂。凝血酶的加入引起荧光猝灭。检测限为  $3.7 \times 10^{-10}$  mol/L<sup>[22]</sup>。

### 2.3 无标记适体

**2.3.1 结构转换信号适体** 有研究所设计结构转换信号适体<sup>[23-24]</sup>,由三条单链寡核苷酸组成:第一条在 5'端标记荧光基团(FDNA),第二条在 3'端以猝灭剂修饰(QDNA),第三条寡核苷酸(未标记)与 FDNA 和 QDNA 都互补。靶物质不存在时,三条 DNA 寡核苷酸链组装成三重复合结构,荧光基团和猝灭剂靠近,引起荧光猝灭。在靶物质存在时,结构被改变,QDNA 释放,荧光强度大量增加。

这种策略也适用于检测 ATP 和凝血酶<sup>[23]</sup>,以 DABCYL 作为猝灭剂,荧光素作为荧光基团。检测 ATP 的线性范围为  $10^{-5} \sim 10^{-3}$  mol/L,而凝血酶为  $10^{-8} \sim 10^{-6}$  mol/L。结构转换发信号适体也用作定量酶活性测定和鉴别酶抑制剂的实时指示器<sup>[24]</sup>。在 AMP 被磷酸酶转变为腺苷后,QDNA 序列释放,荧光信号产生对应于 AMP 到腺苷的转变,且可用于检测酶活性。

最近有人使用未修饰的适体和苂标记的分子信标,用于检测 K<sup>+</sup><sup>[25]</sup>。在 K<sup>+</sup>缺乏时,适体序列和苂标记分子信标杂交。荧光光谱显示一个微弱的单体带。随着 K<sup>+</sup>浓度的升高,由于互补寡核苷酸释放产生一个发夹型的结构,产生的激发态释放强度增加。检测 K<sup>+</sup>范围为  $6 \times 10^{-4} \sim 2 \times 10^{-2}$  mol/L(检测限为  $4 \times 10^{-4}$  mol/L)。

**2.3.2 分子光转换试剂** DNA 嵌入染料或可与 DNA 结合的荧光阳离子共轭聚合物被描述。DNA 嵌入染料的使用简单并且高敏感。已有人报道使用不同物质取代 Turn-off 荧光检测如:折叠的 DNA 嵌入剂如 [Ru(phen)2(dppz)]<sup>2+</sup>,双链 DNA 嵌入剂如溴化乙锭(EB)或 TOTO,单链 DNA 的黏合剂如 OliGreen。

已有人使用分子光转换试剂 [Ru(phen)2(dppz)]<sup>2+</sup> 建立一种敏感的基于适体的检测相思豆毒素的方法<sup>[26]</sup>。复合物在水溶液中没有发光,但是在嵌入双链 DNA 显示强烈荧光<sup>[27]</sup>。当相思豆毒素加入到适体/[Ru(phen)2(dppz)]<sup>2+</sup>溶液,靶物质与试剂竞争并取代它,引起荧光强度的下降。在生理缓冲液或稀释血浆中可检出低至  $10^{-9}$  mol/L 的浓度,线性范围为  $10^{-9} \sim 4 \times 10^{-7}$  mol/L。利用该原理,Wang 等<sup>[28]</sup>利用核酸适体实现对 ATP 的定量分析,检测限达到 1 nmol/L。Fang 等<sup>[28]</sup>还将此原理应用于其他核酸适体传感器的设计,实现对 IgE、PDGF-BB、凝血酶的检测<sup>[29]</sup>,检测灵敏度分别为 0.1、1.0 和 0.01 nmol/L。TOTO 也可代替 [Ru(phen)2(dppz)]<sup>2+</sup>,PDGF-BB 检测限为  $10^{-10}$  mol/L<sup>[30]</sup>。

15-mer 凝血酶结合适体和它的互补链杂交,形成双链 DNA。溴化乙锭(EB)加入后,产生荧光的高信号。在靶物质存在时,适体改变构象结构,释放出互补链和 EB,导致荧光信号可检测到的下降。使用这种方法,检测限为  $2.8 \times 10^{-9}$  mol/L,线性范围为  $2.28 \times 10^{-8}$  mol/L<sup>[31]</sup>。

最近,有人使用 OliGreen(一种可购买的不对称花青染料)和 ATP 结合适体建立一种检测钾离子的方法。OliGreen 有微弱的荧光,但结合单链 DNA 后,荧光强度增强 1 000 倍。在加入 K<sup>+</sup>后,适体从自由卷曲构型变为叠加的 G-四联体。OliGreen/适体复合物分离。并导致荧光强度的减弱。检测限为  $7.5 \times 10^{-8}$  mol/L<sup>[32]</sup>。

有人报道使用多聚酚衍生物聚合物的 Turn-on 检测。阳离子、水溶性、电活性、光敏的聚 3-烷氧基-4-甲基硫脲用于产生清晰的荧光(或比色法)信号<sup>[4]</sup>。在靶物质存在下,适体发生构型改变,从未折叠结构变为折叠结构。阳离子聚合物形成一个自由卷曲形状,并包裹四重结构,从而使这个聚合物形状变成产荧光的。通过使用标准荧光分光光度计,人类 α 凝血酶检测限可达  $10^{-11}$  mol/L,而比色法为  $10^{-7}$  mol/L。

### 3 基于磁共振图像(MRI)的检测

如前文所述,适体可结合多种纳米粒子,例如纳米金粒子或量子点,主要用于比色法或荧光分析。磁性纳米粒子也被用于 MRI。

MRI 是一个细胞和人体的非侵入的三维显像的有效方法。基于 MRI 的分析物传感引起特别关注,因为它可与在活体内环境下轻易检测(更少受生物培养基如血清带来的背景颜色或荧光改变的干扰),可以大多数的其他传感技术竞争<sup>[33]</sup>。最近,MRI 用于检测腺苷<sup>[34]</sup>。研究者选择超顺磁性三氧化二铁粒子作为造影剂。交联的葡聚糖涂渍的超顺磁性三氧化二铁纳米微粒(CLIOs)在 3' 或 5' 端以巯基修饰的 DNA 功能化。与前面描述的方法相同,一个连接 DNA 可以与这些 DNA 序列杂交。这个联结剂的一部分是腺苷适体的序列。当和互补的 DNA 序列联结时,CLIOs 成簇。在腺苷存在时,适体承受构象改变,引起簇的分解。通过测量不同腺苷浓度下高自旋-自旋弛豫时间(T2)松弛时间可以进行定量分析(可低至 2.5 nmol/L)。相比于簇,分散的纳米粒子产生一个 T2。从而,可以通过使 T2 值升高和 T2 加权的 MRI 显像亮度增强来监测腺苷介导的分解。当所有的其他核衣壳不产生增强效应,MRI 增强对腺苷具有高特异性。最近,有人报道了一种结合适体技术和 CLIO 纳米粒子的磁性弛豫转换性质新的方法。与早先报道的基于分析物介导的分解来产生 MRI 亮度增强的系统不同,这种新方法是基于纳米粒子的聚集导致 MRI 亮度的下降<sup>[35]</sup>。

### 4 电化学检测

电化学检测因其固有的简单,高敏感,快速和相对低成本而引起特别关注。第一个电化学适体传感器于 2004 年被报道<sup>[36]</sup>,至此,基于适体的电化学检测主要用于非均相形式<sup>[37]</sup>。最近,更简单和低成本的电化学均相测定也见于报道<sup>[38-39]</sup>。用于凝血酶和 IgE 的检测<sup>[38]</sup>。IgE 或凝血酶结合适体以酰蛋白葡萄糖脱氢酶(PQQGDH)标记,生物素酰化的互补 DNA 链固定在中性链抗生素蛋白磁珠上,靶蛋白不存在时,PQQGDH 标记的适体杂交到固定的互补序列上,而在靶物质存在时,一个复合的适体-靶物质形成。适体靶物质复合物易于回收,通过电化学检测 PQQGDH 活力而测量。这个方法可检测到  $2.7 \times 10^{-10}$  mol/L 的凝血酶和  $10^{-9}$  mol/L 的 IgE。建立在二茂铁基适体的使用的电化学均相测定也用于凝血酶的检测<sup>[39]</sup>。当靶物质与溶液中的适体结合,二茂铁基适体的弥散系数下降,引起一个低的测定的阳性电流值。检测限为  $3.9 \times 10^{-9}$  mol/L。

### 5 结论

均相检测一般比非均相检测敏感性低,但是均相检测简单,易操作,快速并且易自动化。最近有人比较了使用二茂铁基适体的均相断开和非均相接通电化学传感系统<sup>[39]</sup>。非均相方法的适体固定过程费时,并且对凝血酶的检测范围较窄(10 ~ 50 nmol/L)。与非均相途径相比,均相方法非常直接和敏感,检测范围宽 10 倍(10 ~ 500 nmol/L)。以凝血酶作为主要

的研究靶标本来比较不同的检测方法,比色法的敏感性低于最近使用的电化学方法和荧光比色法(此法是最常使用和最敏感的)。使用阳离子多聚酚作为光学指示剂,证实相比于比色法,荧光法是一个比较好的检测方法<sup>[4]</sup>。然而,最近一个建立纤维蛋白原-纳米金粒子结合形成的聚合物的无标记比色法的检测,可以检测凝血酶低至 pmol 水平<sup>[40]</sup>。如此,敏感的基于适体的均相检测法的建立与多数的非均相检测相似,不仅可以使用荧光和比色法,而且可用新报道的 MRI 和电化学方法。使用固定的适体,荧光检测首次报道于 1996 年<sup>[41]</sup>,而电化学方法检测最近报道于 2004 年<sup>[36]</sup>。5 年之后,同样的方案在溶液中使用适体。随着与适体传感器同样的进展,基于适体的电化学均相检测法的建立应该会发展起来,正如最近所证实的,敏感的建立在靶物质结合诱导的 RCA 反应的蛋白质电化学检测方法<sup>[42]</sup>。

## 参考文献

- [1] Ellington AD, Szostak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands[J]. Nature, 1990, 346(6287): 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] van der Vliet HN, Sammels MG, Leegwater AC, et al. Apolipoprotein A-V: a novel apolipoprotein associated with an early phase of liver regeneration[J]. J Biol Chem, 2001, 276(48): 44512-44520.
- [4] Ho HA, Leclerc M. Optical sensors based on hybrid aptamer/conjugated polymer complexes[J]. J Am Chem Soc, 2004, 126(5): 1384-1387.
- [5] Stojanovic MN, Landry DW. Aptamer-based colorimetric probe for cocaine[J]. J Am Chem Soc, 2002, 124(33): 9678-9679.
- [6] Liu JW, Cao ZH, Lu Y. Functional nucleic acid sensors[J]. Chem Rev, 2009, 109(5): 1948-1998.
- [7] Liu J, Lu Y. Fast colorimetric sensing of adenosine and cocaine based on a general sensor design involving aptamers and nanoparticles[J]. Angew Chem Int Ed Engl, 2005, 45(1): 90-94.
- [8] Huang CC, Huang YF, Cao Z, et al. Aptamer-modified Gold nanoparticles for colorimetric determination of platelet-derived growth factors and their receptors[J]. Anal Chem, 2005, 77(17): 5735-5741.
- [9] Wang J, Wang L, Liu X, et al. A gold nanoparticle-based aptamer target binding readout for ATP assay[J]. Adv Mater, 2007, 19(22): 3943-3946.
- [10] Green LS, Jellinek D, Jenison R, et al. Inhibitory DNA ligands to platelet-derived growth factor B-chain[J]. Biochemistry, 1996, 35(45): 14413-14424.
- [11] 刘宏伟, 兰小鹏. 信号适体的设计策略及应用[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2006, 22(10): 787-793.
- [12] Altschuh D, Oncul S, Demchenko AP. Fluorescence sensing of intermolecular interactions and development of direct molecular biosensors[J]. J Mol Recognit, 2006, 19(6): 459-477.
- [13] Jhaveri SD, Kirby R, Conrad R, et al. Designed signaling aptamers that transduce molecular recognition to changes in fluorescence intensity[J]. J Am Chem Soc, 2000, 122(11): 2469-2473.
- [14] Huang CC, Chiu SH, Huang YF, et al. Aptamer-functionalized gold nanoparticles for turn-on light switch detection of platelet-derived growth factor[J]. Anal Chem, 2007, 79(13): 4798-4804.
- [15] Choi JH, Chen KH, Strano MS. Aptamer-capped nanocrystal quantum dots: a new method for label-free protein detection[J]. J Am Chem Soc, 2006, 128(49): 15584-15585.
- [16] Ikanovic M, Rudzinski WE, Bruno JG, et al. Fluorescence assay based on aptamer-quantum dot binding to *Bacillus thuringiensis* spores[J]. J Fluoresc, 2007, 17(2): 193-199.
- [17] Heyduk E, Heyduk T. Nucleic acid-based fluorescence sensors for detecting proteins[J]. Anal Chem, 2005, 77(4): 1147-1156.
- [18] Yamamoto R, Baba T, Kumar PK. Molecular beacon aptamer fluoresces in the presence of tat protein of HIV-1[J]. Genes Cells, 2000, 5(5): 389-396.
- [19] Hamaguchi N, Ellington A, Stanton M. Aptamer beacons for the direct detection of proteins[J]. Anal Biochem, 2001, 294(2): 126-131.
- [20] Levy M, Cater SF, Ellington AD. Quantum-dot aptamer beacons for the detection of proteins[J]. Chembiochem, 2005, 6(12): 2163-2166.
- [21] Tang Z, Mallikaratchy P, Yang R, et al. Aptamer switch probe based on intramolecular displacement[J]. J Am Chem Soc, 2008, 130(34): 11268-11269.
- [22] Li JJ, Fang X, Tan W. Molecular aptamer beacons for real-time protein recognition[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 292(1): 31-40.
- [23] Nutiu R, Li Y. Structure-switching signaling aptamers[J]. J Am Chem Soc, 2003, 125(16): 4771-4778.
- [24] Nutiu R, Yu JM, Li Y. Signaling aptamers for monitoring enzymatic activity and for inhibitor screening[J]. Chembiochem, 2004, 5(8): 1139-1144.
- [25] Shi C, Gu H, Ma C. An aptamer-based fluorescent biosensor for potassium ion detection using a pyrene-labeled molecular beacon [J]. Anal Biochem, 2010, 400(1): 99-102.
- [26] Tang J, Yu T, Guo L, et al. In vitro selection of DNA aptamer against abrin toxin and aptamer-based abrin direct detection[J]. Biosens Bioelectron, 2007, 22(11): 2456-2463.
- [27] Jenkins Y, Friedman AE, Turro NJ, et al. Characterization of dipyridophenazine complexes of ruthenium(II): the light switch effect as a function of nucleic acid sequence and conformation[J]. Biochemistry, 1992, 31(44): 10809-10816.
- [28] Wang J, Jiang Y, Zhou C, et al. Aptamer-based ATP assay using a luminescent light switching complex[J]. Anal Chem, 2005, 77(11): 3542-3546.
- [29] Jiang Y, Fang X, Bai C. Signaling aptamer/protein binding by a molecular light switch complex[J]. Anal Chem, 2004, 76(17): 5230-5235.
- [30] Zhou C, Jiang Y, Hou S, et al. Detection of oncoprotein platelet-derived growth factor using a fluorescent signaling complex of an aptamer and toto[J]. Anal Bioanal Chem, 2006, 384(5): 1175-1180.
- [31] Li B, Wei H, Dong S. Sensitive detection of protein by an aptamer-based label-free fluorescing molecular switch[J]. Chem Commun (Camb), 2007(1): 73-75.
- [32] Huang CC, Chang HT. Aptamer-based fluorescence sensor for rapid detection of potassium ions in urine[J]. Chem Commun (Camb), 2008(12): 1461-1463.
- [33] Sosnovik DE, Weissleder R. Emerging concepts in molecular MRI [J]. Curr Opin Biotechnol, 2007, 18(1): 4-10.
- [34] Yigit MV, Mazumdar D, Kim HK, et al. Smart "turn-on" magnetic resonance contrast agents based on aptamer-functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles [J]. Chembiochem, 2007, 8(14): 1675-1678.

- [35] Yigit MV, Mazumdar D, Lu Y. MRI detection of thrombin with aptamer functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles[J]. Bioconjug Chem, 2008, 19(2): 412-417.
- [36] Ikebukuro K, Kiyohara C, Sode, et al. Electrochemical detection of protein using a double aptamer sandwich[J]. Anal Lett, 2004, 37(14): 2901-2909.
- [37] Sassolas A, Blum LJ, Leca-Bouvier BD. Electrochemical aptasensors[J]. Electroanalysis, 2009, 21(11): 1237-1250.
- [38] Fukasawa M, Yoshida W, Yamazaki H, et al. An Aptamer-based bound/free separation system for protein detection[J]. Electroanalysis, 2009, 21(11): 1297-1302.
- [39] Tan E, Wivianus R, Toh CS. Heterogeneous and homogeneous aptamer-based electrochemical sensors for thrombin[J]. Electro-

## · 综述 ·

# 高敏肌钙蛋白的临床应用进展

翟艳 综述, 谭兵 审校

(天津市第三中心医院检验科, 天津 300170)

**关键词:** 肌钙蛋白; 心血管疾病; 综述

**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.06.028

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1673-4130(2013)06-0697-03

心肌肌钙蛋白是目前反映心肌损伤最敏感和特异的生物学标志物, 广泛用于急性心肌梗死(AMI)的早期诊断、急性冠状动脉综合征(ACS)的早期危险分层、判断心肌缺血再灌注干预效果、预后<sup>[1-4]</sup>。近年来高敏肌钙蛋白(hs-cTn)是心血管内科医师关注的热点, 有关 hs-cTn 与心血管疾病的研究报道层出不穷, 多是集中在:(1)评价 hs-cTn 对 AMI 诊断效率;(2)评价 hs-cTn 与心血管事件危险分层;(3)评价 hs-cTn 与心血管疾病预后等领域。最新的多中心大样本研究确立了 hs-cTn 在心血管事件诊断中的地位, 同时也吹响了 hs-cTn 时代的号角。

## 1 明显改善 AMI 的早期诊断

在症状出现的最初几小时, 由于传统 cTn 检测检测敏感性较低, 需延时 6~12 h, 采集一系列血样进行测定才能进行 AMI 诊断。但是早期、快速的诊断对于 AMI 患者来说又至关重要, 及时的治疗可以极大地提高生存率并改善预后<sup>[5-6]</sup>。

两个大样本的研究显示: hs-cTn 可明显缩短确诊时间, 提高心肌梗死的诊断敏感性, 大大改善 AMI 的早期诊断。

其中一篇是瑞士巴塞尔大学开展的多中心的研究<sup>[7]</sup>, 总共纳入了 718 例疑似心肌梗死患者, 其中 123 例确诊, 595 例被排除。通过雅培 hs-cTnI 检测系统、罗氏 hs-cTnI 和 hs-cTnT 检测系统、西门子 hs-cTnI 检测系统检测所有受试对象的血清(高敏)肌钙蛋白水平, 并以罗氏普通肌钙蛋白 T 检测系统为参照, 采用 ROC 分析比较各个检测系统的诊断效率。结果研究人员发现, 四种 hs-cTn 的曲线下面积(AUC)都维持在 0.95~0.96 之间, 而普通肌钙蛋白的 AUC 仅为 0.90。胸痛 3 h 以内, 四种 hs-cTn 诊断 AMI 的 AUC 在 0.92~0.94 之间, 而普通肌钙蛋白的 AUC 仅为 0.76。将病例进一步分层细化, 作者也发现, 在胸痛发生 10 h 以内, hs-cTn 诊断 AMI 的曲线下面积始终大于普通肌钙蛋白。可见, 与普通肌钙蛋白相比, hs-cTn 更能早期发现和诊断急性心肌梗死。

另一个相似的研究来自德国<sup>[8]</sup>, 这个研究总共纳入了 1 818 例疑似 AMI 患者, 并在入院时、入院 3 h 以及入院 6 h 分别检测其 hs-cTnI、普通肌钙蛋白 T、肌红蛋白、肌酸激酶(CK)

nalysis, 2009, 21(6): 749-754.

- [40] 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.
- [41] Davis KA, Abrams B, Lin Y, et al. Use of a high affinity DNA ligand in flow cytometry[J]. Nucleic Acids Res, 1996, 24(4): 702-706.
- [42] Wu ZS, Zhou H, Zhang S, et al. Electrochemical aptameric recognition system for a sensitive protein assay based on specific target binding-induced rolling circle amplification[J]. Anal Chem, 2010, 82(6): 2282-2289.

(收稿日期: 2012-09-09)

和肌酸激酶同工酶(CK-MB)的质量(活性)浓度。并采用 ROC 分析比较在各个时间点以上各个心肌损伤标志物的诊断效力, 结果表明: 总体上, hs-cTnI 诊断 AMI 的 AUC 为 0.96, 而普通肌钙蛋白 T 的 AUC 只有 0.85, 肌红蛋白、CK 和 CK-MB 的 AUC 分别为 0.82、0.73 和 0.70。在胸痛发生 24 h 以内, hs-cTn 的诊断效力排在其他心肌损伤标志物前面。

Giannitsis 等<sup>[9]</sup> 报道指出, 与普通 cTnT 检测法相比, hs-cTnT 检测法可以检出更多(约 20%)NSTEMI 患者 cTnT 异常升高。

除了普通 cTnT, 和其他心肌标志物, 例如 CKMB-mass 和 MYO 等相比, hs-cTnT 至少可使 20%~40% 的 AMI 患者提早明确诊断。国内外文献中都有报道<sup>[9-11]</sup>。

此外, 通过监测 hs-cTn 浓度的变化可以提高诊断 AMI 的特异性。Apple 等<sup>[12]</sup> 测定了 381 例患者入院时和入院后约 6 h 内的 cTnI。结果发现利用大于 30% 的 cTnI 浓度变化加之基础或住院期间 cTnI 浓度可提高诊断特异性。

## 2 评价心血管事件危险分层

最近的很多关于肌钙蛋白的研究表明其对心血管事件危险分层、评估甚至预测也很有帮助。一项研究对象为 65 岁老人的 2~3 年大样本研究<sup>[13]</sup>。作者对幸存的人群进行了 hs-cTn 水平的检测, 并根据其与首次 hs-cTn 水平的关系将人群分为 3 组: 降低组、持平组、增高组。通过统计学分析后作者发现, 心血管事件死亡风险和心衰的发病率由大到小依次为: 增高组、持平组、降低组。该研究揭示了老年人群中, 基线肌钙蛋白水平以及 2~3 年内 hs-cTn 水平的变化状况均是发生心衰以及心血管事件死亡事件的预示因子, 丰富了 hs-cTn 水平的临床意义。因此在老年人群中, 采用 hs-cTn 进行危险分层, 可能有助于心血管疾病的防治。

另一项研究纳入了因 ACS 到急诊科就诊的 383 例受试者<sup>[14]</sup>。作者将这些人群按照 hs-cTnI 水平分成 4 组: <5.00 ng/L、5.00~9.99 ng/L、10.00~40.00 ng/L、>40.00 ng/L。应用 Kaplan-Meier、Cox 风险比、ROC 曲线和 Logistic 回归分