

• 综 述 •

硅纳米线生物传感器在疾病诊断中的应用*

汪淑婷, 宁 勇 综述, 张国军[△] 审校

(湖北中医药大学检验学院, 湖北武汉 430065)

关键词: 硅纳米线; 场效应晶体管; 生物传感器; 临床检验诊断

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2015. 06. 040

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)06-0811-03

临床检验诊断学的发展日新月异, 新技术、新方法不断出现, 极大提升了实验室的检验能力, 也为临床诊断提供越来越重要的帮助。在低浓度生物分子检测方面, 现有检测方法以标记式检测技术为主, 如酶联免疫吸附法、荧光免疫分析法、放射免疫检测法和化学发光免疫分析法等, 它们通过标记于抗原或抗体上的酶、荧光素、同位素或化学发光剂产生的信号来指示检测分子的含量, 具有灵敏度高、特异性好的优势, 但也存在一些不足之处: (1) 标记过程繁琐、耗时, 标记技术会造成检测时非特异性信号放大。 (2) 检测时间较长, 难以实现实时检测。为此, 发展和建立灵敏、快速、免标记的低浓度生物分子检测方法具有极其重要的意义。

随着学科间的交融渗透, 通过检测生物分子的电荷、质量或其他性质来指示其含量的免标记检测方法逐渐建立, 如场效应晶体管传感器^[1]、压电传感器^[2]和表面等离子体共振技术^[3]等。其中场效应晶体管 (FET) 是一种能够通过外界电场控制沟道导电性的电子元件, 因其沟道导电性也受生物分子电荷影响而用于生物传感器。近年来, 基于硅纳米线 (SiNW) 材料的 FET 传感器以成本低、灵敏度高、能实时响应、易于集成制备、传感性能优异等优点, 受到人们的广泛关注。目前, 硅纳米线场效应晶体管 (SiNW FET) 生物传感器已成功用于多种低浓度生物分子的检测^[4-11], 在临床检验诊断领域展示出巨大的应用前景。

1 SiNW FET 生物传感器简介

SiNW 是直径在纳米尺寸的一维硅材料, 内核是硅, 外有二氧化硅包裹层。在有 SiO₂ 绝缘层的 Si 衬底上, 排列有 SiNW 阵列, 纳米线的两端沉积金属膜, 分别作源极和漏极。在 SiNW 上加缓冲液, 再插入参比电极, 构成液栅装置, 见图 1 (见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。通过参比电极加栅压, 可调节 SiNW 的导电性能, 这种性能变化用源漏电极间电路来监测。当 SiNW 表面修饰有靶分子受体时, 就能捕获检测液中特异性的靶分子, 从而感受由靶分子电荷引起的纳米线导电性能变化, 这种变化在一定范围内与靶分子浓度的对数线性相关, 因此可以定量检测靶物质。

该传感器的特点主要有以下几个方面: (1) 灵敏度高, FET 可以把结合到沟道上的少量靶分子电荷进行信号放大, 且纳米线具有大的比表面积和量子限域效应等, 使得其灵敏度很高^[12], 最低检测限达 fmol/L 水平, 检测范围宽, 在 fmol/L~nmol/L 之间; (2) 响应快速, 可实现在线检测; (3) 由于采用芯片技术, 样本需要量少; (4) 无需标记。结合微流控技术和可直接读取结果的专用集成电路芯片, 可实现样本处理、检测和读取结果一体化。

SiNW FET 传感器也有其自身局限性, 如实际样本检测受

德拜长度的影响和一般不能直接检测不带电荷的物质。对此, 科学家们通过研究得出了一些有效的解决方案。 (1) 德拜长度是溶液中异性离子对生物大分子电荷的屏蔽范围, 超过这个范围生物分子的电荷将不能被 SiNW FET 检测到。德拜长度与溶液离子强度有关, 离子强度越大, 德拜长度越短。通常血清离子强度较高, 德拜长度低于 1 nm^[13], 而生物分子受体包括抗原、抗体和核酸探针的尺寸都远大于此, 因此无法直接在未处理血清中进行实时检测。研究表明通过降低检测液离子强度, 在低浓度的缓冲液如 0. 01×PBS^[4]、稀释血清^[5]或除盐的血清^[6]中实时检测则能进行。此外, 若采用先与待测液反应再换低浓度缓冲液检测的方式, 则能避免德拜长度的影响^[7-8, 14]。 (2) 对于不带电荷的物质, Ah 等^[15]采用竞争法, 使待测靶分子与 SiNW 表面修饰的靶分子竞争结合金纳米粒子表面的受体, 然后在结合于 SiNW 表面的金纳米粒子上沉积金, 引起强烈的信号, 间接指示待测物含量, 和 Chang 等^[16]通过在 SiNW 受体上引入一带电荷物质, 用不带电荷的靶分子与受体结合引起电荷物质释放产生的信号指示其含量, 建立了不带电荷生物分子的 SiNW FET 传感器, 拓宽了这种传感器的应用范围。

2 SiNW FET 生物传感器在疾病诊断中的应用

SiNW FET 生物传感器在低浓度的生物分子检测方面的上述优势, 使其具有广泛的临床应用价值。近年来, 科学家们通过用 SiNW FET 生物传感器检测生物标志物, 展示了其在多种疾病诊断中的应用潜能。

2.1 肿瘤早期检测

肿瘤标志物检测对肿瘤早期诊断具有重要意义^[17]。Zheng 等^[6]成功用 SiNW FET 生物传感器对多种肿瘤标志物 (包括 PSA、CEA 和黏蛋白) 进行了检测。通过在 SiNW 上修饰 PSA 单克隆抗体, 检测缓冲液基质中不同浓度的 PSA, 结果沟道电导率变化与 PSA 浓度线性相关, 线性范围为 90 fg/mL~5 ng/mL, 最低检测限达 75 fg/mL (约 2 fmol/L)。该传感器具有普适性, 将修饰抗体变换为相应靶分子抗体, 作者实现了对 CEA 和黏蛋白的检测, 最低检测限分别低至 100 fg/mL (0. 55 fmol/L) 和 75 fg/mL (0. 49 fmol/L)。比已报道的^[18-19] SPR 免标记蛋白质检测限高出约 10³ 数量级。除了高灵敏度, 该传感器还有较好的选择性, 检测 0. 9 pg/mL PSA 时, 加入浓度为其一千万倍的 BSA 干扰物, 信号与没干扰物的一致。另外, 它还具有多重检测能力, 在芯片不同通道上修饰不同抗体, 可同时检测多种靶分子。Huang 等^[20]用多晶硅也构建了 PSA 的 SiNW FET 生物传感器。此外, 还有 SiNW FET 生物传感器检测 CRP、AFP 和 8-羟基脱氧鸟苷的报道^[21-23]。

除了蛋白质成分的生物标志物, miRNA 也被认为是肿瘤诊断的理想指标^[24-25]。但由于 miRNA 在样品中含量很少, 简

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21275040)。 作者简介: 汪淑婷, 女, 在读硕士, 主要从事生物传感器研究。 [△] 通讯作者, E-mail: zhanggj@hbtcm. edu. cn。

单、灵敏的检测方法显得非常重要。Zhang 等^[9]用 SiNW FET 生物传感器构建了一种直接、灵敏的 miRNA 检测方法。在 SiNW 上修饰与待测 miRNA 互补的肽核酸(PNA)序列,构建的 FET 传感器可实现 HeLa 细胞中的 miRNA (let-7b)的检测。其检测原理是利用 PNA-RNA 杂交,将待测 miRNA 捕获到 PNA-功能化的 SiNW FET 传感表面,RNA 所带电荷使 SiNW 电导率发生变化,从而达到检测 miRNA 的目的,最低检测限达 1 fmol/L。该方法能直接检测出 HeLa 细胞总 RNA 提取物中的 miRNA 含量,结果与已报道的一致。该传感器还能识别单碱基错配的序列,特异性强。Gao 等^[10]也通过在 SiNW FET 的沟道上修饰 DNA 探针,检测了肺癌细胞中的 miRNA,结果能检测到 1 fmol/L 的 miR-21 序列,并对单核苷酸多态性的检测具有高度特异性。

2.2 心脏病检测 心脏病是严重威胁人类健康的三种重大疾病之一。心脏病的快速诊断和病情监测很大程度上依赖于血清心肌标志物的检测。SiNW FET 生物传感器因其高灵敏度和实时响应的特点,近年来在心肌标志物检测中展示了其检测的优越性。Chua 等^[4]制备了用于 cTnT 蛋白实时检测的传感器。在修饰了 cTnT 抗体的 SiNW 上,加入含 cTnT 的缓冲液时,传感器立即产生响应,检测信号在 100~200 s 即稳定,最低检测限达 1 fg/mL;在该传感器中加入含 cTnT 的除盐血清(背景蛋白质浓度是 cTnT 的 10^{12} 倍),也能迅速产生响应,不过由于非特异性物质的干扰,获得稳定信号需要的时间有所延长,最低检测限为 30 fg/mL,比酶联免疫吸附法检测的最低检出限高出 3 个数量级^[26]。

在此基础上,Zhang 等^[7]报道了一种将微流控过滤芯片和 SiNW FET 传感器集成在一起,直接检测全血中心肌标志物的集成检测微系统,可对至少 2 μ L 的全血中心肌标志物 cTnT、CK-MB 和 CK-MM 检测,检测过程在 45 min 内完成,最低检测限为 1 pg/mL。此后又报道了一种将 SiNW FET 传感器与用于直接读取结果的专用集成电路芯片集成在一起的检测系统^[8],可对血清中 3 种心肌标志物 cTnT、CK-MB 和 CK-MM 同时检测,检测结果与传统的探针台测量法相关性良好。该装置简单、有效,且能多通道同时检测,无需大型的检测仪器,有望制成便携式心脏病检测仪。

2.3 内分泌疾病检测 激素检测在内分泌疾病诊断中具有重要作用。但由于其含量低,检测较困难。Regonda 等^[5]用 SiNW FET 构建了一种灵敏的胰岛素生物传感器:在 SiNW 上修饰胰岛素抗体后,可识别和捕获胰岛素,通过检测传感器电信号的变化可指示胰岛素的含量,结果显示,该方法可检出缓冲液和稀释的人血清中低至 10 fmol/L 的胰岛素水平。SiNW FET 生物传感器对胰岛素的检测是一种新的高灵敏度、免标记检测技术,有望用于更多种类的激素检测。

2.4 感染性疾病检测 病毒在感染性疾病中占有重要的地位,但目前实验室检测方法所耗时间较长,因此研发快速、准确的病毒检测手段极为必要。Shen 等^[27]构建了一种用 SiNW FET 灵敏、快速检测甲型流感病毒 H3N2 的传感器,可对患者呼出气体中 H3N2 病毒直接检测,最低检测浓度为 29 个病毒每微升。该方法通过用 H3N2 抗体修饰的磁珠对患者呼出气体中 H3N2 病毒进行免疫分离和浓缩,再用修饰有 H3N2 抗体的 SiNW FET 检测,结果与金标法 RT-qPCR 的检测结果符合度达 90%。但该传感器可在数分钟内完成检测过程,相比于 RT-qPCR 的数小时,极大地节省了检测时间。同时,该传感器还能区分甲型流感病毒 H1N1 亚型,具有较好的选择性。除此以外,Zhang 等^[28]和 Huang 等^[11]分别构建了单通道和多

通道登革热病毒 SiNW FET 生物传感器。将登革热病毒 RNA 逆转录扩增为 DNA 后,用带有 PNA 探针的 SiNW FET 生物传感器来检测。Lin 等^[29]也构建了高致病性禽流感病毒 H5 和 H7 链的 SiNW FET 生物传感器。这些传感器最低都能检测到 fmol/L 水平的病毒核酸,同时还能区分同种病毒的不同亚型。为病毒检测提供了新的手段。

除上述疾病外,SiNW FET 生物传感器还可用于电解质、凝血功能和中枢神经系统疾病等的检测,如钾离子^[30]、赭曲霉毒素 A^[15]和多巴胺^[31]的 SiNW FET 传感器均有报道,体现了其在临床检验诊断领域广泛的应用价值。

3 小 结

随着科学家们的努力,SiNW FET 生物传感器的制备工艺和检测条件正在不断优化,传感器性也在逐步提高。但由于纳米尺寸的 SiNW 制作还存在挑战,各种 SiNW FET 生物传感器之间的性能尚存在差异,制备性能一致的 SiNW FET 生物传感器仍有一定的困难。SiNW FET 生物传感器的制备还仅限于实验室水平,大规模生产还需要时间,使得其离实际应用还有一段距离。目前,简单且性能一致的 SiNW FET 传感器制备方法亟待发展。另外,继续探索 SiNW FET 传感器在其他生物分子检测方面的应用,以及 SiNW FET 传感器与现有技术如磁珠免疫分离、PCR 和微流控等的联用,以此扩大检测范围、提高灵敏度和自动化程度,是 SiNW FET 生物传感器在临床检验诊断领域应用的重要研究方向。

参考文献

- [1] Caras S,Janata J. Field effect transistor sensitive to penicillin[J]. Anal Chem,1980,52(12):1935-1937.
- [2] Plomer M,Guilbault G G,Hock B. Development of a piezoelectric immunosensor for the detection of enterobacteria[J]. Enzyme Microb Technol,1992,14(3):230-235.
- [3] Van Regenmortel MH. Binding measurements as surrogate biological assays: surface plasmon resonance biosensors for characterizing vaccine components[J]. Dev Biol,2000,103(3):69-74.
- [4] Chua JH,Chee RE,Agarwal A,et al. Label-free electrical detection of cardiac biomarker with complementary metal-oxide semiconductor-compatible silicon nanowire sensor arrays [J]. Anal Chem,2009,81(15):6266-6271.
- [5] Regonda S,Tian R,Gao J,et al. Silicon multi-nano channel FETs to improve device uniformity/stability and femtomolar detection of insulin in serum[J]. Biosens Bioelectron,2013,45(34):245-251.
- [6] Zheng G,Patolsky F,Cui Y,et al. Multiplexed electrical detection of cancer markers with nanowire sensor arrays[J]. Nat Biotechnol,2005,23(10):1294-1301.
- [7] Zhang GJ,Luo ZH,Huang MJ,et al. An integrated chip for rapid, sensitive, and multiplexed detection of cardiac biomarkers from fingerprick blood[J]. Biosens Bioelectron,2011,28(1):459-463.
- [8] Zhang GJ, Chai KTC, Luo HZH, et al. Multiplexed detection of cardiac biomarkers in serum with nanowire arrays using readout ASIC[J]. Biosens Bioelectron,2012,35(1):218-223.
- [9] Zhang GJ,Chua JH,Chee RE,et al. Label-free direct detection of MiRNAs with silicon nanowire biosensors [J]. Biosens Bioelectron,2009,24(8):2504-2508.
- [10] Gao A,Lu N,Dai P,et al. Label-free and ultrasensitive detection of microrna biomarkers in lung cancer cells based on silicon nanowire FET biosensors [C]//Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (TRANSDUCERS & EUROSensors XXVII),2013 Transducers & Eurosensors XXVII;The 17th International Conference on. IEEE,2013:2439-2442.

- [11] Huang MJ, Xie H, Wan Q, et al. Serotype-specific Identification of Dengue virus by silicon nanowire array biosensor[J]. J Nanosci Nanotechnol, 2013, 13(6): 3810-3817.
- [12] Cui Y, Wei Q, Park H, et al. Nanowire nanosensors for highly sensitive and selective detection of biological and chemical species [J]. Science, 2001, 293(5533): 1289-1292.
- [13] Heitzinger C, Klimeck G. Computational aspects of the three-dimensional feature-scale simulation of silicon-nanowire field-effect sensors for DNA detection[J]. J Com Electron, 2007, 6(3): 387-390.
- [14] Kim A, Ah CS, Park CW, et al. Direct label-free electrical immunodetection in human serum using a flow-through-apparatus approach with integrated field-effect transistors[J]. Biosens Bioelectron, 2010, 25(7): 1767-1773.
- [15] Ah CS, Park CW, Yang JH, et al. Detection of uncharged or feebly charged small molecules by field-effect transistor biosensors[J]. Biosens Bioelectron, 2012, 33(1): 233-240.
- [16] Chang KS, Chen CC, Sheu JT, et al. Detection of an uncharged steroid with a silicon nanowire field-effect transistor[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2009, 138(1): 148-153.
- [17] Etzioni R, Urban N, Ramsey S, et al. The case for early detection [J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(4): 243-252.
- [18] Campagnolo C, Meyers KJ, Ryan T, et al. Real-Time, label-free monitoring of tumor antigen and serum antibody interactions[J]. J Biochem Biophys Methods, 2004, 61(3): 283-298.
- [19] Haes AJ, Hall WP, Chang L, et al. A localized surface plasmon resonance biosensor: first steps toward an assay for Alzheimer's disease[J]. Nano Letters, 2004, 4(6): 1029-1034.
- [20] Huang YW, Wu CS, Chuang CK, et al. Real-time and label-free detection of the prostate-specific antigen in human serum by a polycrystalline silicon nanowire field-effect transistor biosensor [J]. Analytical chemistry, 2013, 85(16): 7912-7918.
- [21] Lee MH, Lee KN, Jung SW, et al. Quantitative measurements of C-reactive protein using silicon nanowire arrays[J]. Int J Nanomedicine, 2008, 3(1): 117-124.
- [22] Ivanov YD, Pleshakova TO, Kozlov AF, et al. SOI nanowire for the high-sensitive detection of HBsAg and α -fetoprotein[J]. Lab on a Chip, 2012, 12(23): 5104-5111.
- [23] Thomas DJ, Azmi MAM, Tehrani Z. Fabrication of an Integrated 3-Dimensional Printed Polymer Silicon Nanowire-Based Microfluidic Point-of-Care System for Detecting 8-OHdG Cancer Biomarker[J]. Point of Care, 2014, 13(2): 54-65.
- [24] Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection[J]. Proc Natl Acad Sci, 2008, 105(30): 10513-10518.
- [25] Cho W. MicroRNAs: potential biomarkers for cancer diagnosis, prognosis and targets for therapy[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2010, 42(8): 1273-1281.
- [26] Müller-Bardorff M, Hallermayer K, Schröder A, et al. Improved troponin T ELISA specific for cardiac troponin T isoform; assay development and analytical and clinical validation[J]. Clin Chem, 1997, 43(3): 458-466.
- [27] Shen F, Wang J, Xu Z, et al. Rapid flu diagnosis using silicon nanowire sensor[J]. Nano Lett, 2012, 12(7): 3722-3730.
- [28] Zhang GJ, Zhang L, Huang MJ, et al. Silicon nanowire biosensor for highly sensitive and rapid detection of Dengue virus[J]. Sensors and Actuator B: Chemical, 2010, 146(1): 138-144.
- [29] Lin CH, Hung CH, Hsiao CY, et al. Poly-silicon nanowire field-effect transistor for ultrasensitive and label-free detection of pathogenic avian influenza DNA [J]. Biosens Bioelectron, 2009, 24(10): 3019-3024.
- [30] Chang KS, Sun CJ, Chiang PL, et al. Monitoring extracellular K^+ flux with a valinomycin-coated silicon nanowire field-effect transistor[J]. Biosens Bioelectron, 2012, 31(1): 137-143.
- [31] Lin CH, Hsiao CY, Hung CH, et al. Ultrasensitive detection of dopamine using a polysilicon nanowire field-effect transistor[J]. Chem Commun, 2008, 15(44): 5749-5751.

(收稿日期: 2014-10-15)

• 综 述 •

脑创伤半暗带和脑水肿与水通道蛋白-4 关系的研究进展*

任欢欢 综述, 鲁 宏[△]审校

(中南大学湘雅医学院附属海口医院/海口市人民医院放射科, 海南海口 570208)

关键词: 脑创伤; 半暗带; 水通道蛋白-4; 脑水肿

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2015. 06. 041

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)06-0813-03

近年来由于脑创伤频发,随之继发颅内高压导致脑疝等严重并发症,降低了患者的存活率。研究者已经发现脑缺血后早期,缺血中心坏死区已无逆转可能,而其周围的半暗带组织若及时治疗,对患者的预后有决定性作用。脑创伤后是否也存在一个类似的“创伤半暗带”,如何运用影像学技术界定该区域,该区域水肿情况如何,以及与水通道蛋白-4(AQP4)表达有何关系。本文将针对以上问题查阅相关文献并加以综述。

1 背景资料

随着交通业和建筑业的迅猛发展,随之而来的脑创伤发生

率与日俱增。脑挫伤常伴有不同程度的脑水肿,可致神经元以及胶质细胞的功能障碍,同时因脑组织肿胀所致颅内高压及脑疝,这是导致患者死亡的重要原因。脑创伤病情变化迅速、病理改变复杂、临床上很难准确把握病程并予以及时针对性治疗,往往会导致患者高致残率、高病死率^[1]。脑损伤后坏死的核心区脑组织属不可逆损伤,失去了临床研究价值,但创伤周边仍存在可逆性脑组织即“创伤半暗带”,它可以向恶化及好转两方面发展,如能及时正确干预使其最大限度地逆转,已成为当今医学研究的热点。

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81160181)。 作者简介:任欢欢,女,医师,主要从事中枢神经系统影像诊断工作研究。 [△] 通讯作者, E-mail: cqluh@sohu. com。