

• 专家述评 •

核酸荧光探针检测在临床疾病分子诊断中的应用

沈辰^{1,2}, 罗宇睿¹, 李美¹, 罗耀¹, 孙旭平^{2△}, 应斌武^{1▲}

1. 四川大学华西医院实验医学科, 四川成都 610041; 2. 电子科技大学基础与前沿研究院, 四川成都 610054

摘要:核酸荧光探针检测正逐渐成为临床疾病分子诊断的重要手段。这项技术主要应用具有高度特异性的荧光探针靶向疾病相关核酸序列, 从而实现对目标核酸的高灵敏度、高特异性检测。核酸荧光探针检测在临床中的应用十分广泛, 包括感染性疾病、遗传性疾病和肿瘤的诊断。而随着纳米技术的不断发展, 具有更高检验效能的核酸荧光探针检测体系也不断产生。其中基于荧光淬灭纳米材料构建的均相核酸检测体系由于其较高的检测能力和简单的体系, 将有助于进一步推动疾病分子诊断的发展。该文主要述评了核酸荧光探针检测在多种疾病诊断中的临床应用, 并讨论了利用荧光淬灭纳米材料构建的均相核酸检测新体系的原理和应用价值。

关键词:核酸荧光探针检测; 分子诊断; 感染性疾病; 遗传性疾病; 肿瘤; 纳米材料

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2023.12.001 **中图法分类号:**R446.9

文章编号:1673-4130(2023)12-1409-07 **文献标志码:**A

Application of nucleic acid fluorescence probe detection in molecular diagnosis of clinical diseases

SHEN Chen^{1,2}, LUO Yurui¹, LI Mei¹, LUO Yao¹, SUN Xuping^{2△}, YING Binwu^{1▲}

1. Department of Laboratory Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China; 2. Institute of Fundamental and Frontier Sciences, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu, Sichuan 610054, China

Abstract: Nucleic acid fluorescence probe detection is becoming an important way of molecular diagnosis of clinical diseases. This technology mainly uses highly specific fluorescent probes to target disease-related nucleic acid sequences, so as to achieve high sensitivity and high specificity detection of target nucleic acids. Nucleic acid fluorescence probe detection is widely used in clinical diagnosis, including infectious diseases, genetic diseases and tumors. With the continuous development of nanotechnology, fluorescence probe detection systems with higher testing efficiency of nucleic acid have been produced. Among them, the homogeneous nucleic acid detection system based on fluorescence quenched nanomaterials will contribute to further promote the development of disease molecular diagnosis due to its high detection capability and simple system. In this paper, the clinical application of nucleic acid fluorescence probe detection in the diagnosis of a variety of diseases is reviewed, and the principle and application value of a new homogeneous nucleic acid detection system based on fluorescence quenched nanomaterials are discussed.

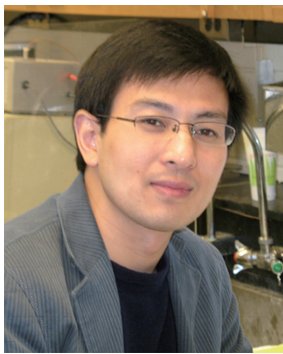
Key words: nucleic acid fluorescence probe detection; molecular diagnosis; infectious diseases; genetic diseases; tumor; nanomaterials

专家简介:孙旭平, 博士, 教授, 电子科技大学基础与前沿研究院博士生导师。获中国科学院院长优秀奖(2004)、中国科学院优秀博士学位论文(2007)、全国百篇优秀博士学位论文(2008)。入选四川省“千人计划”创新领军人才(2016)、四川省学术和技术带头人(2018)、英国皇家化学会高被引作者(2017-2020)、化学领域中国高被引学者(2018-2019)、材料科学领域中国高被引学者(2020-2021)、化学和材料科学领域全球高被引科学家(2018-2020)、全球顶尖前 10 万科学家(2020-2022)、英国皇家化学会会士(2020)。担任 Nano Research Energy 副主编。长期致力于纳米功能材料设计、结构调控及催化和传感应用研究。已在 Nat Commun, J Am Chem Soc, Angew Chem 等刊物发表研究论文 600 余篇, 论文总引 6.3 万次, H 指数 130。

专家简介:应斌武, 医学博士, 博士后, 工商管理硕士, 教授, 博士研究生导师。四川大学华西医学技术学院副院长、华西临床医学院医学检验系/华西医院实验医学科主任。中华医学会检验专委会第十一届委员会常务委员、中国医师协会第四届检验医师分会常务委员、四川省医学会第十二届临床检验专委会主委、四川省医师协会第三届检验医师分会候任会长。担任 Chinese Chemical Letters 高级编委、Chinese Medical Journal 编委及《中华检验医学杂志》《四川大学学报(医学版)》《国际检验医学杂志》等杂志编委。主要从事于感染性疾病的分子诊断学研究。负责 5 项国家自然科学基金、2 项科技部重大专项子课题、1 项教育部博士点新教师基金、3 项四川省科技厅重点研发计划等项目。已发表论文 200 余篇, 获国家发明专利 10 项。

△ 通信作者, E-mail: xpsun@uestc.edu.cn. ▲ 共同通信作者, E-mail: yingbinwu@scu.edu.cn.

网络首发 [http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20230506.1524.002.html\(2023-05-08\)](http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1176.R.20230506.1524.002.html(2023-05-08))



孙旭平



孙斌武

核酸荧光探针检测是一种强大的分子诊断工具,正不断改变临床诊断领域。该技术主要涉及使用荧光探针,特异性结合目标核酸序列,从而实现靶核酸的检测,并具有高灵敏度和特异性^[1]。同时这种方法还可以检测疾病相关的基因突变^[2]。基于荧光标记的靶向核酸荧光探针已成为从细胞生物学、分子生物学和化学生物学到临床诊断和药物研究等各个领域不可或缺的工具^[3]。近年来,核酸荧光探针检测已成为众多疾病分子诊断的重要手段,包括感染性疾病、遗传性疾病和肿瘤^[4-6]。与传统诊断方法如细菌培养、实时荧光定量 PCR、酶联免疫吸附试验、电化学发光免疫分析及肿瘤的病理学检查等相比,该技术在检测速度、准确性和灵敏度等多方面都具有优势,并成了早期发现和监测疾病的理想工具^[7]。

核酸荧光探针检测主要是基于核酸杂交和荧光共振能量转移(FRET)的原理。FRET 通常在能量供体和能量受体相互作用可调谐的系统中观察到。在光激发时,处于激发态的供体的电子激发可以转移到处于基态的受体上。在 FRET 中,供体发射光谱和受体吸收光谱必须是重叠的,两者之间的距离应该在 $10\sim 100\text{ \AA}$ ^[8-9]。在核酸荧光探针检测技术中,荧光探针被设计成特异性地结合到目标核酸序列。该探针由相互靠近的荧光团和淬灭剂分子组成。当探针与靶核酸序列结合时,荧光团和淬灭剂分离,从而释放出与标本中存在的靶核酸数量呈正相关的荧光信号^[10]。

核酸荧光探针检测最重要的应用之一是在感染性疾病的诊断中。该技术可以直接从患者标本中检测病毒和细菌等病原体,从而能够快速准确地诊断各种感染性疾病,包括新型冠状病毒感染、流感和结核病等^[11]。通过识别病原体的特定核酸序列,临床医生可以精确鉴定感染的病原体种类及其特定型别,并针对其量身定制治疗方案,从而改善患者的治疗效果,及早隔离患者,减少感染性疾病的传播^[12]。此外,核酸荧光探针可以特异性识别具有耐药性的病原体,有利于临床医生及时使用敏感的药物,避免不必要的治疗,改善患者预后。

除感染性疾病外,核酸荧光探针检测还用于遗传

性疾病的诊断。许多遗传性疾病都是由特定基因突变引起的,核酸荧光探针对于这些突变的检测具有较高的灵敏度和特异性,尤其是对于诊断一些由特征明确的基因突变引起的遗传性疾病,如囊性纤维化、镰状细胞性贫血和亨廷顿病等^[13]。

核酸荧光探针检测的另一个重要应用是在肿瘤的诊断和监测中。利用特异性核酸荧光探针可以检测肿瘤相关的基因突变,从而实现早期发现、预防和制订个性化治疗方案的目的。通过监测肿瘤细胞遗传谱随时间的变化,核酸荧光探针检测也可用于跟踪肿瘤的进展和评估治疗的有效性^[5]。此外通过检测患者外周血中的循环肿瘤细胞和循环肿瘤 DNA,可以实现对患者的无创早期检查^[14]。

本文主要述评了核酸荧光探针检测分别在感染性疾病、遗传性疾病和肿瘤诊断中的应用。最后本文还讨论了具有荧光淬灭功能的纳米材料应用于核酸荧光探针检测的策略和临床应用价值。

1 核酸荧光探针用于感染性疾病的检测

感染性疾病仍然是一个重大的全球公共卫生问题,在世界范围内造成相当高的发病率和病死率^[15]。感染性疾病的快速、准确诊断对于有效的疾病管理和控制至关重要。核酸荧光探针检测是一种强大的分子诊断技术,为感染性疾病病原体的检测带来了革命性的变化。

1.1 病毒感染的诊断

核酸荧光探针检测进一步推动了病毒感染诊断效率的提高,可以直接从患者标本中快速准确地检测出病毒病原体。这种技术在诊断新发和再发病毒[如新型冠状病毒(SARS-CoV-2)和流感病毒]感染方面特别有用。在新型冠状病毒感染中,采用核酸荧光探针检测技术检测患者标本中是否存在 SARS-CoV-2 RNA,从而实现疾病的快速诊断和管理。最近的一项研究就构建了一种 SARS-CoV-2 RNA 检测芯片,当荧光 DNA 探针与目标序列杂交时,利用核酸内切酶 IV 切割特定位点,在局部热等离子场中,使得带有荧光团和淬灭剂两条短链从目标序列中解离并发射荧光信号^[16]。这项技术可以在低浓度水平[检测限可达到 $(0.275\pm 0.051)\text{ fmol/L}$]下实现 30 min 内快速、可靠的 SARS-CoV-2 核酸序列检测,并且避免了复杂的核酸扩增流程,提高了检测的效率。核酸荧光探针检测同样也被应用于流感病毒的诊断中^[17]。最近就有研究开发了一种基于 DNA 模板纳米银簇的新型无标记荧光传感器,用于检测甲型 H5N1 流感病毒(简称 H5N1)RNA 中具有代表性的 H5N1 基因序列^[18]。当体系中存在目标基因时,Ag⁺就会被整合并产生荧光,从而实现 H5N1 的定性和定量检测。这一核酸荧光探针检测体系具有较宽的线性范围($500\text{ pmol/L}\sim 2\text{ }\mu\text{mol/L}$),同时检

测限低至 500 pmol/L。

核酸荧光探针检测技术还被用于检测一些慢性的病毒感染[如人类免疫缺陷病毒(HIV)和乙型肝炎病毒(HBV)慢性感染]并监测患者的病毒载量,判断患者感染状态,及时进行适当的治疗^[19]。目前已有一些研究设计了基于荧光材料的病毒核酸检测探针,并表现出极高的灵敏度。例如,一项研究利用量子点的发射可调特性,制备了基于 CdTe 量子点的 HBV 双链 DNA(dsDNA)检测系统^[20]。最初,CdTe 量子点的荧光被荧光淬灭剂 Ru 完全淬灭。在加入 dsDNA 的情况下,Ru 从 CdTe 量子点中移除,产生自由 CdTe 量子点和 Ru-dsDNA 复合物。它们可以在同一波长激发并发射叠加荧光。这种核酸荧光探针检测系统对 dsDNA 的浓度很敏感。采用 0.5 nmol/L CdTe 量子点,可检测到浓度为 10 pg/mL 的 dsDNA,且不受其他核酸物质干扰。在另一项研究中,研究者设计了一种基于氮硫掺杂还原氧化石墨烯和量子点荧光标记的 HBV 与 HIV 核酸荧光探针检测系统^[21]。利用荧光的淬灭与恢复,这一系统可以在 5 min 内同时检测两种病毒感染(HBV 检出限降低到 2.4 nmol/L, HIV 检出限降低到 3.0 nmol/L),极大提高了诊断的效率。

此外,利用核酸荧光探针检测病毒核酸可以实现对病毒在体内感染过程的追踪,即单病毒跟踪技术。最新的一项研究结果显示,利用量子点标记的单个病毒或病毒成分的感染行为可以在宿主细胞中以毫秒到小时的时间尺度和纳米级精度进行跟踪,这有助于揭示病毒的感染机制^[22]。在一项研究中,研究者使用 CdTe:Zn²⁺ 量子点修饰磷酸化 DNA,构建了一种量子点纳米信标^[23],这种荧光量子点探针可以在活 HIV 集成细胞中检测和成像单个 HIV RNA,这类技术不仅可以检测病毒感染,同时可以实现对活细胞中单个病毒 RNA 的追踪。

1.2 细菌感染的诊断 病原体的超灵敏检测和快速鉴定对于细菌感染患者通过适当的抗菌药物治疗提高生存率至关重要。目前作为临床鉴定细菌感染的“金标准”是细菌培养,需要大量的血液、痰液等临床标本及烦琐的培养和表型鉴定步骤。整个鉴定过程非常耗时(几天甚至几周),且十分依赖于操作人员的专业知识。而核酸荧光探针检测作为一种灵敏的手段已被广泛应用于细菌感染的诊断,可以快速、准确地检测出细菌病原体^[24]。

结核病是一种由生长缓慢的病原体结核分枝杆菌引起的感染性疾病,据世界卫生组织估计,结核病每年导致了 200 万人的死亡,目前检测结核分枝杆菌的方法灵敏度较差,且耗时很长,假阴性率高^[25]。因此迫切需要新的手段来提高结核病诊断的准确性和

灵敏度,并缩短检测时间。最近就有研究者设计了一种靶向结核分枝杆菌 rpoB 基因的荧光寡核苷酸 rpoBMTC 探针,利用荧光原位杂交技术(FISH)对痰标本中的结核分枝杆菌进行检测。在灵敏度方面,rpoBMTC 可以检测到 10³ CFU/mL 的结核分枝杆菌^[26]。利用特殊的核酸荧光探针,FISH 技术同样也被证明可以在痰液中精准检测出非结核分枝杆菌(NTM),从而实现对 NTM 感染的快速诊断和结核分枝杆菌的鉴别^[27]。基于纳米技术的荧光探针同样被应用于结核分枝杆菌的检测中。有研究者采用强荧光寡核苷酸功能化 CdSe1-xSx/CdS 纳米棒(NRs)作为多色杂交探针,针对 rpoB 基因中与利福平耐药相关的热点区域,设计了一种结核分枝杆菌核酸荧光探针检测策略。这一技术利用半导体 NRs 作为多色荧光团的高光稳定性特点,实现了在痰液中高灵敏度(检测限低至 0.4 pmol/L)和高特异性地检测结核分枝杆菌的目的^[28]。这些荧光探针通过靶向 rpoB 基因,在检测结核分枝杆菌的同时也可以判断利福平治疗的耐药性,有利于临床医生制订个性化的治疗方案。

核酸荧光探针检测在耐抗菌药物细菌感染的诊断中具有较好的应用,如耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)和耐万古霉素肠球菌(VRE)。在 MRSA 感染诊断中,核酸荧光探针检测可以用于检测 mecA 基因的存在,该基因与甲氧西林等 β -内酰胺类耐药有关。这能够帮助医生快速识别 MRSA 感染,并实施适当的感染控制措施和抗菌药物治疗^[29]。SHI 等^[30]就利用石墨烯量子点(GQDs)和金纳米颗粒(AuNPs)开发了一种新型 FRET 生物传感器,用于金黄色葡萄球菌特异性基因序列检测。当目标寡核苷酸与捕获探针和报告探针共杂交,形成夹心结构,使 GQDs 和 AuNPs 靠近,从而触发 FRET 效应,导致荧光淬灭,实现对靶序列的检测。该系统的检出限约为 1 nmol/L,在检测金黄色葡萄球菌的同时对于其耐药性也可以有效判断。

1.3 真菌感染的诊断 核酸荧光探针检测也被应用于真菌感染的诊断。这种技术在诊断侵袭性真菌感染方面特别有用,如曲霉菌病和念珠菌病^[31]。基于 FRET 技术的实时荧光定量 PCR 已被证明在检测肺泡灌洗液和肺组织中的烟曲霉 DNA 时具有较高的灵敏度和特异性^[32]。最近在临床上,FISH 也被证实了其检测曲霉菌,并排除毛霉菌感染的能力^[33]。对于念珠菌感染,肽核酸荧光原位杂交探针表现出较好的检测能力^[34]。肽核酸是一类以多肽骨架取代糖磷酸主链的 DNA 类似物。结合肽核酸荧光探针和微流控技术可以设计念珠菌检测芯片,从而实现对念珠菌感染的床旁快速检测。

2 核酸荧光探针用于遗传性疾病的检测

遗传性疾病是由 DNA 序列的改变引起的,可导致广泛的临床表现,包括发育异常、代谢障碍和癌症^[35]。遗传性疾病的早期诊断对于受影响个体的有效管理和治疗至关重要。核酸荧光探针检测是一种强大的分子诊断技术,可以提高遗传性疾病的诊断效率。通过使用荧光探针,特异性结合目标核酸序列,能够快速、准确地检测遗传病相关基因突变,从而及时判断遗传病因。大约 20 年前,就有研究证明了荧光量子点标记的 DNA 探针在检测遗传基因突变中的价值,这说明核酸荧光探针检测在遗传性疾病中的强大诊断能力^[13]。利用微阵列技术结合核酸荧光探针可以对多个遗传病相关突变位点或是表观遗传学改变进行检测,从而进一步提高诊断的效率^[36]。

核酸荧光探针检测被证明可以应用于诊断单基因遗传性疾病如囊性纤维化、镰状细胞性贫血和亨廷顿病^[37]。对于囊性纤维化,核酸荧光探针检测可以用于检测 CFTR 基因突变的存在,从而实现对该疾病的快速诊断和管理。有研究就结合 AuNPs 和分子信标构建了囊性纤维化相关的基因突变——F508 突变检测系统,可以精确鉴别突变型和野生型基因,检测限可以达到 1 nmol/L^[38]。亨廷顿病主要是由其致病基因中 CAG 重复序列扩增引起。针对这一基因异常, YANG 等^[39]构建了一种包含 RNA 探针和氧化石墨烯的荧光检测平台,用于检测亨廷顿病的生物标志物 CAG 重复序列。利用 RNA 酶特异性消化互补双链释放荧光,可以将 CAG 重复序列检测下限降低至 108 pmol/L。可以看出,使用核酸荧光探针检测,可以利用核酸相关的不同机制实现对单基因病的高特异性、高灵敏度的检测。这将有助于这些遗传病的及早诊断,进而实现及早治疗和干预的目的。

核酸荧光探针检测也被广泛应用于染色体异常的诊断,能够快速、准确地检测出非整倍体和染色体结构异常。这项技术可以用于唐氏综合征、特纳综合征和克氏综合征的诊断中^[40]。利用 FISH 技术,通过核酸荧光探针可以有效鉴别唐氏综合征患者的染色体异常^[41]。

核酸荧光探针检测也被用于胚胎植入前遗传学诊断(PGD),能够在着床前快速、准确地检测胚胎的基因突变。这项技术有助于避免携带遗传性疾病的患儿出生,为可能将遗传性疾病传给后代的父母提供准确有效的产前诊断。在 PGD 中,从胚胎中提取单细胞,并进行核酸荧光探针检测,以检测基因突变的存在。这项技术能够选择不携带基因突变的胚胎,增加成功怀孕和健康婴儿出生的机会^[42]。

3 核酸荧光探针用于肿瘤的检测

肿瘤是全球死亡的主要原因,癌症的早期发现和

准确监测对于成功治疗和改善患者预后至关重要。核酸荧光探针检测能够快速准确地检测与肿瘤发生相关的基因突变,从而实现对患者的早期检测、个性化治疗和治疗反应监测。随着纳米技术的发展,越来越多的基于纳米材料的纳米荧光探针被用于克服目前肿瘤诊断方法的局限性。利用这些纳米荧光探针特殊的理化性质,可以实现对早期肿瘤的精准检测并协助临床医生制订个性化的诊断方案^[43]。

3.1 肿瘤的早期发现 核酸荧光探针检测已被广泛应用于肿瘤的早期检测,能够快速、准确地检测出与肿瘤发生相关的基因突变。这项技术在乳腺癌、肺癌和结直肠癌的早期检测中具有较高的价值。对于乳腺癌患者,核酸荧光探针检测可以用于检测 BRCA1 和 BRCA2 基因突变的存在,这与乳腺癌的风险增加有关,进而能够实现对患者的早期发现和个性化治疗,改善患者的预后。最近就有研究结合微流控技术和 DNA 荧光探针构建了 BCRA2 基因突变检测芯片,同时结合集成的微加热器和发光温度传感器,可以用于乳腺癌 BRCA2 基因的筛选^[44]。表皮生长因子受体(EGFR)突变被认为是导致非小细胞肺癌(NSCLC)的一种生物标志物,其中约 45% 的 NSCLC 患者具有 EGFR 基因 19 号外显子的缺失。KIM 等^[45]就通过使用无淬灭剂的荧光 DNA 探针和氧化石墨烯构建了一种检测 19 号 EGFR 外显子缺失的检测体系。这一方法的检测限可以低至 0.1%。KRAS 基因突变是结直肠癌中常见的基因突变,在约 40% 的患者中发生,且与患者的不良预后相关。WU 等^[46]设计了一种双链足尖交换核酸探针,它被荧光分子和淬灭剂标记,以检测肿瘤组织中的 KRAS 突变。该探针能够区分出在野生型 DNA 背景中 5% 的突变等位基因,并具有极高的特异性和稳定性。

3.2 肿瘤“个性化”治疗 肿瘤的复杂性和异质性突出了肿瘤“个性化”治疗的价值。肿瘤“个性化”治疗指根据不同肿瘤中存在的基因突变选择合适的靶向治疗。而随着肿瘤相关突变研究的不断深入和检测手段(如核酸荧光探针检测)的不断发展,这些“个性化”的治疗策略正逐渐变为现实^[47-48]。以肺癌为例,核酸荧光探针检测被用于检测 EGFR 和间变性淋巴瘤激酶(ALK)基因突变的存在,这与靶向治疗如厄洛替尼和克唑替尼的敏感性有关^[49-50]。DONG 等^[51]设计了称为“多米诺探针”的细胞内 DNA 探针,并构建了一种多功能单个活细胞分析纳米平台。这一系统可以快速识别肺癌患者单个细胞的 EGFR 基因突变,并将荧光信号放大 10 倍。这项技术可以解决肿瘤细胞单细胞异质性分析问题,有助于“个性化”肺癌的药物治疗方案的制订。而对于 ALK 基因突变,分离 FISH 已经被美国食品药品监督管理局批准为检测

NSCLC ALK 重排的方法,并在临床研究中证明了其较好的检测性能^[52]。随后对于 FISH 技术的改进和创新(如高通量分离 FISH)也进一步提高了 ALK 检测的灵敏度和特异性,并实现了更为精准的定量检测^[53]。

4 展 望

基于 FRET 或淬灭机制的均相荧光分析已经在核酸检测中受到了广泛关注。这些检测技术使用的探针(如 Taqman 探针和分子信标等)往往同时标记有荧光报告剂和淬灭剂,并且只有当探针与靶序列杂交后荧光报告剂与淬灭剂物理分离时才会释放荧光。它们的缺点是探针两端都需要标记特定的染料,这一组染料需要经过特定的筛选,增加了检测的成本。而如果使用纳米结构作为荧光团的淬灭剂,则可以消除检测中荧光团-淬灭剂组合的选择问题,因为相同的纳米结构能够淬灭不同发射频率的染料。这种策略仅需要单个荧光标记的单链 DNA 作为检测探针,这降低了整个核酸荧光探针检测体系的制作成本和复杂程度。同时利用纳米材料特殊的理化性质和高表面活性,能够进一步提高检测体系的灵敏度。笔者先前的研究已经证明了碳纳米结构是可以用于此类核酸检测的优秀淬灭剂,包括介孔碳、碳纳米管、碳纳米球、多壁碳纳米管和纳米 C60^[54]。此外,更大范围的一些纳米材料,如共轭聚合物纳米结构、配位聚合物纳米带、聚吡咯胶体纳米球等同样也被证明可以作为均相核酸检测体系中的荧光淬灭剂^[55]。此类核酸检测往往通过类似的步骤完成:(1)纳米材料吸附并淬灭荧光染料标记的单链 DNA(ssDNA)探针;(2)探针与其目标核酸序列后续杂交产生 dsDNA,使得该 dsDNA 从纳米材料上分离,并恢复染料荧光。这类传感平台能够区分完全互补和不匹配的目标核酸序列,具有高选择性,可以精确到单碱基不匹配。例如,利用钴磷纳米线(CoP NWs)表现出的较高荧光淬灭能力,以及对 ssDNA 和 dsDNA 具有不同亲和力的特性,构建了一种针对 HIV 核酸的均相荧光纳米传感器。运用和上面类似的原理,当目标序列不存在时,荧光探针吸附在 CoP NWs 上,其荧光被淬灭。当目标病毒核酸出现时就会和荧光探针形成双链结构,进而从 CoP NWs 分离并恢复荧光。这一传感器的检测限为 100 pmol/L,选择性低至单碱基错配^[56]。进一步探索不同纳米材料的可能性,可以构建检测更加迅速,检测限更低的核酸荧光检测体系。例如应用硝酸铁配位聚合物纳米线可以将检测时间缩短至 15 min 内,同时有着 0.2 nmol/L 的检测低限^[57]。而使用铁基金属有机框架纳米棒作为荧光淬灭材料则可以将检测时间进一步缩短至 4 min 内,同时检测低限降至 10 pmol/L^[58]。可以看出利用荧光淬灭纳米材料构

建核酸荧光探针检测体系在检测目标核酸(如病原体、肿瘤的核酸)方面巨大的应用潜力,在简化检测体系的同时还具有较高的检测效能。通过对不同纳米材料的筛选,这一新体系将能够应对各种临床需求,具有广阔的应用空间。

总的来说,核酸荧光探针检测是一种功能多样且强大的工具,并对现有的疾病分子诊断产生了巨大的影响。它具有高灵敏度和高特异性检测疾病相关核酸序列的能力,使其成为从传染病到癌症等众多疾病的早期检测和诊断的重要工具。而以纳米技术为代表的新兴技术的不断发展,也为核酸荧光探针检测的进一步优化带来了新的机遇,通过材料和机制的不断改善,越来越多的方法更为便捷、成本更低、灵敏度和特异性更高的检测体系被构建,进而满足临床日益增加的需求。笔者有足够的理由相信核酸荧光探针检测将会在未来疾病的诊断中发挥越来越重要的作用。

参考文献

- [1] DUVAL R, DUPLAIS C. Fluorescent natural products as probes and tracers in biology[J]. Nat Prod Rep, 2017, 34(2):161-193.
- [2] OWITI N A, NAGEL Z D, ENGELWARD B P. Fluorescence sheds light on DNA damage, DNA repair, and mutations[J]. Trends Cancer, 2021, 7(3):240-248.
- [3] SUSEELA Y V, NARAYANASWAMY N, PRATHI HAR S, et al. Far-red fluorescent probes for canonical and non-canonical nucleic acid structures: current progress and future implications[J]. Chem Soc Rev, 2018, 47(3):1098-1131.
- [4] HANG Y J, BORYCZKA J, WU N Q. Visible-light and near-infrared fluorescence and surface-enhanced Raman scattering point-of-care sensing and bio-imaging: a review [J]. Chem Soc Rev, 2022, 51(1):329-375.
- [5] CHINEN A B, GUAN C M, FERRER J R, et al. Nanoparticle probes for the detection of cancer biomarkers, cells, and tissues by fluorescence[J]. Chem Rev, 2015, 115(19):10530-10574.
- [6] LI C C, WANG Z Y, WANG L J, et al. Biosensors for epigenetic biomarkers detection: a review[J]. Biosens Bioelectron, 2019, 144:111695.
- [7] WU L P, LIU J H, LI P, et al. Two-photon small-molecule fluorescence-based agents for sensing, imaging, and therapy within biological systems [J]. Chem Soc Rev, 2021, 50(2):702-734.
- [8] CHANDA K, MM B. Light emitting probes-approaches for interdisciplinary applications [J]. Chem Soc Rev, 2021, 50(6):3706-3719.
- [9] WU Y C, LIU Z K, XU X A. Molecular subtyping of hepatocellular carcinoma: a step toward precision medicine [J]. Cancer Commun (Lond), 2020, 40(12):681-693.

- [10] STANISAVLJEVIC M, KRIZKOVA S, VACULOVICOVA M, et al. Quantum dots-fluorescence resonance energy transfer-based nanosensors and their application[J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 74:562-574.
- [11] HUSSAIN W, ULLAH M W, FAROOQ U, et al. Bacteriophage-based advanced bacterial detection: concept, mechanisms, and applications[J]. *Biosens Bioelectron*, 2021, 177:112973.
- [12] PRUDENT E, RAOULT D. Fluorescence in situ hybridization, a complementary molecular tool for the clinical diagnosis of infectious diseases by intracellular and fastidious bacteria[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2019, 43(1):88-107.
- [13] ZHANG C Y, YE H C, KUROKI M T, et al. Single-quantum-dot-based DNA nanosensor [J]. *Nat Mater*, 2005, 4(11):826-831.
- [14] IGNATIADIS M, SLEDGE G W, JEFFREY S S. Liquid biopsy enters the clinic-implementation issues and future challenges[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, 18(5):297-312.
- [15] SYNOWIEC A, SZCZEPAŃSKI A, BARRETO-DURAN E, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2): a systemic infection[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2021, 34(2):e00133-20.
- [16] QIU G Y, GAI Z B, SALEH L, et al. Thermoplasmonic-assisted cyclic cleavage amplification for self-validating plasmonic detection of SARS-CoV-2 [J]. *ACS Nano*, 2021, 15(4):7536-7546.
- [17] UYEKI T M, HUI D S, ZAMBON M, et al. Influenza[J]. *Lancet*, 2022, 400(10353):693-706.
- [18] ZHANG Y, MU F, DUAN Y F, et al. Label-free analysis of H5N1 virus based on three-segment branched DNA-templated fluorescent silver nanoclusters[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, 12(43):48357-48362.
- [19] GHARAEI H A, FARAROUEI M, MIRZAZADEH A, et al. The global and regional prevalence of hepatitis C and B co-infections among prisoners living with HIV: a systematic review and meta-analysis[J]. *Infect Dis Poverty*, 2021, 10(1):93.
- [20] ZHANG R, ZHAO D X, DING H G, et al. Sensitive single-color fluorescence "off-on" switch system for dsDNA detection based on quantum dots-ruthenium assembling dyads[J]. *Biosens Bioelectron*, 2014, 56:51-57.
- [21] CHEN L, SONG L P, ZHANG Y C, et al. Nitrogen and sulfur codoped reduced graphene oxide as a general platform for rapid and sensitive fluorescent detection of biological species[J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2016, 8(18):11255-11261.
- [22] WANG Z G, LIU S L, PANG D W. Quantum dots: a promising fluorescent label for probing virus trafficking [J]. *Acc Chem Res*, 2021, 54(14):2991-3002.
- [23] MA Y X, MAO G B, HUANG W R, et al. Quantum dot nanobeacons for single RNA labeling and imaging[J]. *J Am Chem Soc*, 2019, 141(34):13454-13458.
- [24] XIAO M S, ZOU K, LI L, et al. Stochastic DNA walkers in droplets for super-multiplexed bacterial phenotype detection[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2019, 58(43):15448-15454.
- [25] FURIN J, COX H, PAI M. Tuberculosis [J]. *Lancet*, 2019, 393(10181):1642-1656.
- [26] LOUKIL A, KIRTANIA P, BEDOTTO M, et al. FISHing Mycobacterium tuberculosis complex by use of a rpoB DNA probe bait [J]. *J Clin Microbiol*, 2018, 56(10):e00568-18.
- [27] BALIGA S, MURPHY C, SHARON L, et al. Rapid method for detecting and differentiating Mycobacterium tuberculosis complex and non-tuberculous mycobacteria in sputum by fluorescence in situ hybridization with DNA probes[J]. *Int J Infect Dis*, 2018, 75:1-7.
- [28] IBRAHIM S A, CHAN Y. Fluorescent semiconductor nanorods for the solid-phase polymerase chain reaction-based, multiplexed gene detection of Mycobacterium tuberculosis [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2021, 13(30):35294-35305.
- [29] BILYK B L, PANCHAL V V, TINAJERO-TREJO M, et al. An interplay of multiple positive and negative factors governs methicillin resistance in staphylococcus aureus [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2022, 86(2):e0015921.
- [30] SHI J Y, CHAN C Y, PANG Y K, et al. A fluorescence resonance energy transfer (FRET) biosensor based on graphene quantum dots (GQDs) and gold nanoparticles (AuNPs) for the detection of mecA gene sequence of Staphylococcus aureus[J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 67:595-600.
- [31] LEINBERGER D M, SCHUMACHER U, AUTENRIETH I B, et al. Development of a DNA microarray for detection and identification of fungal pathogens involved in invasive mycoses[J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43(10):4943-4953.
- [32] O' SULLIVAN C E, KASAI M, FRANCESCONI A, et al. Development and validation of a quantitative real-time PCR assay using fluorescence resonance energy transfer technology for detection of *Aspergillus fumigatus* in experimental invasive pulmonary aspergillosis [J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(12):5676-5682.
- [33] KESSEL J, HOGARDT M, ASPACHER L, et al. Exclusion of mucorales co-infection in a patient with aspergillus flavus sinusitis by fluorescence in situ hybridization (FISH)[J]. *J Fungi (Basel)*, 2022, 8(3):306.
- [34] KIM H J, BREHM-STECHER B F. Design and evaluation of peptide nucleic acid probes for specific identification of *Candida albicans* [J]. *J Clin Microbiol*, 2015, 53(2):511-521.
- [35] EICHLER E E. Genetic variation, comparative genomics, and the diagnosis of disease[J]. *N Engl J Med*, 2019, 381(1):64-74.

- [36] JIMÉNEZ B P, KAYSER M, VIDA K I A. Revisiting genetic artifacts on DNA methylation microarrays exposes novel biological implications[J]. *Genome Biol*, 2021, 22(1):274.
- [37] ZHOU Y B, HUA J, DING D, et al. Interrogating amyloid aggregation with aggregation-induced emission fluorescence probes[J]. *Biomaterials*, 2022, 286:121605.
- [38] BENI V, HAYES K, LERGA T M, et al. Development of a gold nano-particle-based fluorescent molecular beacon for detection of cystic fibrosis associated mutation[J]. *Biosens Bioelectron*, 2010, 26(2):307-313.
- [39] YANG Z Q, HU Q X, QIN L, et al. RNase H amplified RNA probe and graphene oxide system for highly sensitive detection of (CAG)_n DNA repeat sequences[J]. *Nanotechnology*, 2019, 30(46):465502.
- [40] DÖHNER H, STILGENBAUER S, BENNER A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia[J]. *N Engl J Med*, 2000, 343(26):1910-1916.
- [41] ZIPURSKY A, WANG H, BROWN E J, et al. Interphase cytogenetic analysis of in vivo differentiation in the myelodysplasia of down syndrome[J]. *Blood*, 1994, 84(7):2278-2282.
- [42] YAN L Y, QIAO J, CHEN Y, et al. Application of three-dimensional fluorescence in situ hybridization to human preimplantation genetic diagnosis[J]. *Fertil Steril*, 2009, 92(4):1492-1495.
- [43] LUBY B M, CHARRON D M, MACLAUGHLIN C M, et al. Activatable fluorescence: from small molecule to nanoparticle[J]. *Adv Drug Del Rev*, 2017, 113:97-121.
- [44] LIN X Y, NAGL S. A microfluidic chip for rapid analysis of DNA melting curves for BRCA2 mutation screening[J]. *Lab Chip*, 2020, 20(20):3824-3831.
- [45] KIM D M, KIM D H, JUNG W, et al. Fluorometric detection of EGFR exon 19 deletion mutation in lung cancer cells using graphene oxide[J]. *Analyst*, 2018, 143(8):1797-1804.
- [46] WU Z H, MA T, COLL J L, et al. Detection of KRAS mutations using double-stranded toehold-exchange probes[J]. *Biosens Bioelectron*, 2016, 80:175-181.
- [47] SICKLICK J K, KATO S, OKAMURA R, et al. Molecular profiling of cancer patients enables personalized combination therapy: the I-PREDICT study[J]. *Nat Med*, 2019, 25(5):744-750.
- [48] YURKOVICH J T, TIAN Q, PRICE N D, et al. A systems approach to clinical oncology uses deep phenotyping to deliver personalized care[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2020, 17(3):183-194.
- [49] DENG H, LEI Q, WANG C D, et al. A fluorogenic probe for predicting treatment response in non-small cell lung cancer with EGFR-activating mutations[J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1):6944.
- [50] XIA P Y, ZHANG L, LI P, et al. Molecular characteristics and clinical outcomes of complex ALK rearrangements identified by next-generation sequencing in non-small cell lung cancers[J]. *J Transl Med*, 2021, 19(1):308.
- [51] DONG Z Z, YAN S, LIU B, et al. Single living cell analysis nanoplatfrom for high-throughput interrogation of gene mutation and cellular behavior[J]. *Nano Lett*, 2021, 21(11):4878-4886.
- [52] GAO X, SHOLL L M, NISHINO M, et al. Clinical implications of variant ALK FISH rearrangement patterns[J]. *J Thorac Oncol*, 2015, 10(11):1648-1652.
- [53] BURMAN B, MISTELI T, PEGORARO G. Quantitative detection of rare interphase chromosome breaks and translocations by high-throughput imaging[J]. *Genome Biol*, 2015, 16(1):146.
- [54] LIU Q, PU Z H, ASIRI A M, et al. Bamboo-like nitrogen-doped carbon nanotubes toward fluorescence recovery assay for DNA detection[J]. *Sens Actuators B Chem*, 2015, 206:37-42.
- [55] WANG L, ZHANG Y W, TIAN J Q, et al. Conjugation polymer nanobelts: a novel fluorescent sensing platform for nucleic acid detection[J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(6):e37.
- [56] TIAN J Q, CHENG N Y, LIU Q, et al. Cobalt phosphide nanowires: efficient nanostructures for fluorescence sensing of biomolecules and photocatalytic evolution of dihydrogen from water under visible light[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2015, 54(18):5493-5497.
- [57] ZHOU Y C, LIU Q, SUN X P, et al. Fe-nitilotriacetic acid coordination polymer nanowires: an effective sensing platform for fluorescence-enhanced nucleic acid detection[J]. *Nanotechnology*, 2017, 28(7):075101.
- [58] TIAN J Q, LIU Q, SHI J L, et al. Rapid, sensitive, and selective fluorescent DNA detection using iron-based metal-organic framework nanorods: synergies of the metal center and organic linker[J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 71:1-6.

(收稿日期:2023-03-28 修回日期:2023-04-30)

(本文编辑:张梨虹 张耀元)