

基于核酸适配体和纳米粒子的光学探针^{*}

王国庆 陈兆鹏 陈令新^{**}

(中国科学院烟台海岸带研究所 烟台 264003)

摘 要 核酸适配体 (aptamer) 是一类通过指数富集的配体系统进化技术 (SELEX) 经体外筛选得到的单链 DNA 或 RNA。核酸适配体借自身形成的空间结构与靶标分子特异性结合, 具有靶分子广、亲和力高、特异性强、易改造修饰等特点, 因而在生命科学、临床诊断、药物发现和环境科学等方面得以广泛应用。近年来, 核酸适配体与纳米技术结合, 并利用纳米材料在光学、磁学、电学、化学及生物学方面表现出的特殊性质, 实现了对靶标分子高灵敏度、高选择性、简便快速的识别与检测。本文评述了基于核酸适配体-纳米粒子特性的光学探针在生物大分子、金属离子和有机小分子检测等领域的应用现状与发展趋势, 主要包括比色法、荧光光谱法、表面增强拉曼光谱法等。

关键词 核酸适配体 纳米粒子 传感器 光学探针

中图分类号: O65; Q5 **文献标识码**: A **文章编号**: 1005-281X(2010)02/3-0489-11

Aptamer-Nanoparticle-Based Optical Probes

Wang Guoqing Chen Zhaopeng Chen Lingxin^{**}

(Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China)

Abstract Aptamers are short single-stranded DNA (ssDNA) or RNA by in vitro screening of systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX). Based on their special structures which are easily rebuilt and modified, aptamers are of high affinity and specificity with a wide range of targets. These advantages have motivated aptamers to find broad applications for biomedicine, clinic diagnosis, drug discovery, environmental science and so on. Recently, aptamers integrated with nanotechnology have realized simple and rapid recognition of various targets with high sensitivity and selectivity owing to the novel optical, magnetic, electric, chemical and biological properties of nanomaterials. This paper reviews the latest advances and trends of aptamer-nanomaterial-based optical probes for biomolecules, metal ions and organic compounds, including colorimetry, fluorescence and surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS).

Key words aptamer; nanoparticles; sensors; optical probes

Contents

- 1 Introduction
- 2 Aptamer and nanoparticles-based optical probes
 - 2.1 Colorimetric assay
 - 2.2 Fluorescence detection method

- 2.3 SERS sensors
- 3 Conclusion and prospects

1 引言

建立高灵敏、高通量、特异性强的靶标分子快速检测是目前分析化学面临的紧迫任务。近年的研究

收稿: 2009 年 3 月, 收修改稿: 2009 年 4 月

*国家自然科学基金项目 (No. 20975089)、山东省科技攻关计划项目 (No. 2008GG20005005) 和烟台市科技攻关计划项目 (No. 2007156) 资助

** Corresponding author e-mail: lxchen@yic.ac.cn

表明,脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA)不仅起遗传信息储存和传递的作用,还可以借自身形成的空间结构与其他类型的分子相互作用。以此为基础建立随机寡核苷酸文库,施加选择压力(结合靶标),淘选与靶标高度特异结合片段的过程,被称为指数富集的配体系统进化(systematic evolution of ligand by exponential enrichment, SELEX)技术(图1)。这类经体外筛选技术得到的能够特异性结合靶物质的由十几个或几十个核苷酸组成的寡聚核苷酸片段(即 ssDNA 或 RNA)^[1, 2],被称为核酸适配体(apramer,源于拉丁语 *aptus*,即配对、适应之意,以下简称适配体)。这种筛选出的适配体不依赖于生物体或细胞环境,具有空间结构多样和靶标分子广泛的特点,对包括金属离子、有机小分子、生物分子,甚至细胞和微生物在内的各类靶物质具有特异识别作用^[3-7],被喻为“化学抗体”^[8],因而在很大程度上冲破了核酸只作为遗传信息存储和转运载体的传统认识。适配体还具有分子量小、易体外合成和修饰^[9]、化学稳定性好等优点,故一经出现便成为化学工作者用于分子识别和靶标物检测研究的得力工具。显然,适配体的这些特点对于发展高灵敏、高选

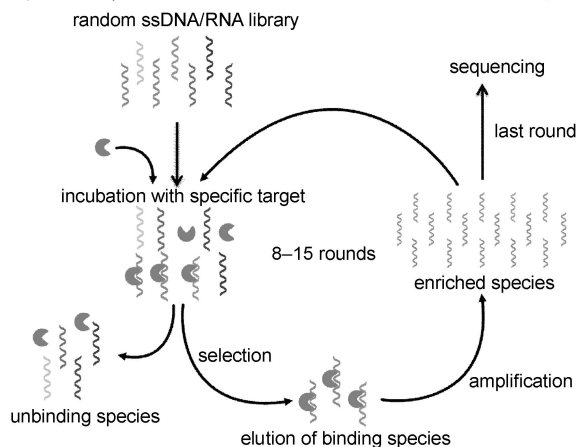


图 1 SELEX技术流程图。随机 ssDNA/RNA文库中不同寡核苷酸与特定靶标孵育,随后从混合物中分离出与靶标结合的寡核苷酸序列。在对其进行 PCR 扩增形成次级 ssDNA/RNA文库后,进入第二轮筛选。一般经 8—15 轮筛选富集后,可获得具有高亲和性的适配体

Fig 1 Diagram for the SELEX enrichment A random nucleic acid library is incubated with a specific target The ssDNA/RNA binding to the target are eluted from the mixture. After PCR amplification, the products are subjected to the next round of selection. The selection cycles continue until the final high-affinity ssDNA/RNA species for the target is identified

择性、快速高通量的靶标分子分析检测十分重要,并且渐成为分析化学领域的研究和应用的热点。纳米材料技术是伴随着材料科学技术和微制作技术的融合而逐步发展起来的新技术,标志着人类改造自然的能力延伸至分子、原子水平。物质加工至纳米尺度(1—100nm),其基本单元或微粒的尺寸接近光波长,且具有极大的比表面积,使得材料表现出量子尺寸效应、小尺寸效应、表面效应和宏观量子隧道效应等诸多特殊效应,进而在光学、磁学、电学、化学及生物学方面表现出许多特殊性质。纳米材料的光学特性一直吸引着分析化学家的注意。一般地,纳米材料光学性质对粒子尺寸、形状(纳米粒子、纳米棒等)、粒子间距及粒子表面性质十分灵敏,与传统光学检测方法相结合往往具有表面增强效果和信号放大作用^[10, 11]。适配体特异性识别技术借助纳米材料的光学特性进行靶标分析物检测,无疑为环境化学、生物化学、分子生物学、医学尤其是分析化学等领域提供了一种高效、快速、灵敏的分析检测研究平台。鉴于已有文献对基于适配体传感的电化学、质敏(mass-sensitive)等信号获取手段进行了综述^[8, 12-14],本文着重对基于适配体和纳米粒子的光学检测最新研究进展做了综述,包括比色法、荧光光谱法、表面增强拉曼光谱法(surface-enhanced Raman spectroscopy, SERS)等,并对这类适配体纳米粒子探针技术发展趋势进行了展望。

2 基于适配体 纳米粒子的光学检测

一般地,适配体在与靶标分子特异性结合后,其三级结构将发生改变,随之发生变化的有适配体的电荷密度、吸附性质和空间位阻等一系列因素。采用纳米粒子材料不仅可以将上述这些变化因素转化为可检测的光学、电化学等信号,而且还可以提高分析检测的灵敏度。光学检测方法一般具有操作方便、过程简易和灵敏度高优点,是化学分析的重要手段和普遍方法之一。基于适配体和纳米材料的光学识别一直是这一领域的主要研究方法,以下分别对比色、荧光、SERS等检测方法进行评述。

2.1 比色法

许多纳米材料的表观颜色在纳米微粒的表面性质发生改变后会发生相应的变化,以此为基础通过颜色对比建立起来的方法称为比色法。以 AuNP (gold nanoparticle, AuNP)水溶胶为例,AuNP表面的同性电荷相互排斥,使粒子间保持一定的动态距离而稳定存在。小粒径 AuNP (10—100nm)水溶胶

一般呈红色或紫红色。这一物理现象源于电磁场引起的 AuNP 表面电子的相干振动。当有可见光入射时, AuNP 会吸收其共振波长, 引起表面电子以偶极模形式振动。如 13nm AuNP 吸收绿光, 对应其位于 520nm 的可见吸收峰, 故溶胶显红色。若向这一 AuNP 溶胶中加入高浓度盐 (如 NaCl), 则会因 AuNP 表面的双电层被破坏而发生聚集。此时, 聚集态 AuNP 间表面等离子激元耦合, 入射光对表面电子的极化变为非均一、低能量形式的极化, 其结果是 AuNP 的吸收峰变宽并红移至 650nm 左右, AuNP 的颜色也由红色变为紫色 (或蓝紫色)。依据这一现象, Mirkin 等^[15]率先开展了 DNA 调节 AuNP 聚集度用于检测 DNA 的比色分析法研究。适配体对靶物质的特异识别与之类似。下面以目标分析物进行分类, 简单概述比色法检测技术。

2.1.1 生物大分子

适配体代表着—类功能与抗体类似的新型分子。随着能与蛋白质等生物大分子特异结合的适配体陆续被筛选和发现, 这一比色技术日渐成为生物大分子识别和检测的有力工具。例如, 采用凝血酶适配体修饰的 AuNP 可以高灵敏检测凝血酶分子^[16]。在适配体识别凝血酶的反应中, 两个适配体分子会与一个凝血酶分子的两个位点分别结合, 导致 AuNP 的粒子间距和紫外-可见吸收光谱发生变化。将聚集的 AuNP 离心收集并溶于氢氯酸 (HCl) 溶液作为“种子”, 加入还原剂, 使 AuNP 进一步“长大”, 使得在相同凝血酶浓度下, AuNP 颜色变化加深, 从而提高检测灵敏度, 检出限为 2nM。Wang 等^[17]对这种方法做了改进, 即在凝血酶适配体修饰的 AuNP 对凝血酶发生特异识别和比色分析后, 将具有比色“增强”效果的银化学沉积到 AuNP 表面, 并进行斑点印迹 (dot-blot) 分析。结果表明, 0.115pM 的凝血酶检测可以用肉眼识别, 检出限可达 14M; 实验还证实了凝血酶适配体的高选择性, 牛血清蛋白甚至凝血酶、凝血酶等其他蛋白质分子均不影响凝血酶的检测, 证实了该适配体的高选择性。Li 等^[18]采用类似增强原理实现了对血小板衍生生长因子 B 链同型二聚体 PDGF-BB (platelet-derived growth factors B-chain homodimer, PDGF-BB) 的高灵敏检测, 检出限为 83 aM。根据适配体与 PDGF-BB 结合后的空间结构特点, 他们设计了“AuNP 表面 PDGF-BB 适配体-PDGF-BB 生物素酰化的 PDGF-BB 适配体”的“三明治”夹心结构, 并连接凝血酶适配体一端的生物素

与修饰微孔板表面的抗生物素蛋白, 在 Ag 增强效应下, 可快速实现对凝血酶的比色检测。与酶联免疫吸附分析法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 相比, 整个检测过程由 5h 缩短至 1h, 而且灵敏度高出 3 个数量级, 其线性检测范围为 1M—100pM (ELISA: 10pM—10nM)。Jana 等^[19]合成了二氧化硅包被的 AuNP, 并在粒子表面修饰凝血酶适配体, 当适配体分子与凝血酶分子结合时, 由于纳米粒子间距缩小, 致使纳米粒子聚集而变色, 可用于检测凝血酶。这种纳米比色传感器对凝血酶的线性检测范围为 10—1 000 nM, 肉眼观测的检出限为 25nM, 与抗体修饰的纳米比色分析法灵敏度相当。此外, 该类纳米粒子具有粒径小、稳定性好、位阻效应小、利于蛋白质键合等优点。采用比色法中常用的金、银增强, 因粒径小导致的光学横截面小、光学信号弱等缺点也得到克服。

作为乳腺癌标志物的 PDGF 有 PDGF-AA、PDGF-AB 和 PDGF-BB 3 类。Huang 等^[20]报道的检测 PDGF-AA 的原理如下: 含适量 NaCl 的 PDGF 适配体修饰的 AuNP (apt-AuNP) 溶胶中, 加入少量 PDGF-AA, 适配体与 PDGF-AA 特异结合使 AuNP 聚集, 溶胶的颜色由红色变为紫色; 进一步升高 PDGF 浓度至与 AuNP 表面的适配体结合达到饱和后, 若继续提高 PDGF 浓度, AuNP 粒子簇由于静电斥力及位阻作用而解聚, AuNP 溶胶又呈现红色。即随 PDGF 浓度升高, $E_{x_{650}}/E_{x_{530}}$ 经历先升高后降低两个过程。因而, 可在较宽 PDGF-AA 浓度范围内得到 PDGF-AA 浓度与 $E_{x_{650}}/E_{x_{530}}$ 的双阶段关系曲线, 检出限为纳摩尔水平。同样, 采用 apt-AuNP 也可实现对其它两类 PDGF 的纳摩尔水平检测。由于 PDGF 的受体 (PDGF receptor, PDGFR) 和适配体均对 PDGF 有高度亲和性, 通过竞争反应, 即向 PDGF 诱导的聚集态 apt-AuNP 中加入 PDGFR, 导致聚集度降低, 可以实现对 PDGFR 的比色检测, 其检出限为 3.2nM。

癌细胞免疫分析实质上也是 DNA 或蛋白质等生物大分子的检测。由于适配体-纳米粒子的比色检测灵敏度高、操作简易, 因而对蛋白质分析和癌症诊断具有重要意义。Medley 等^[6]以适配体修饰的 AuNPs 实现了人类急性淋巴细胞白血病 CCRF-CEM 细胞 (CCL-119 T-cell, human acute lymphoblastic leukemia) 的检测, 并使用伯基特淋巴瘤 Ramos 细胞 (CRL-1596, B-cell, human Burkitt's lymphoma) 做对比检测。CCRF-CEM 细胞适配体用巯基标记后,

用于修饰 AuNP 表面。透射电镜图像表明,当这种 AuNP 聚集于癌细胞膜表面,适配体与细胞膜上的靶物质发生特异识别, AuNP 将由分散态转变为微米级聚集态结构。与分散态 AuNP 相比,聚集态结构与光相互作用时具有更大的散射光强和消光系数,从而导致吸收光谱的变化。在 CM (cell media) 和 FBS (fetal bovine serum) 中,探针只对靶标细胞有特异识别,检出限为 90 个癌细胞。该纳米比色探针的选择性和灵敏度令人满意。实验同样证明了 Ramos 细胞适配体修饰的 AuNP 对 Ramos 细胞的高灵敏度和选择性。

适配体与纳米粒子之间的作用方式除可依靠化学修饰形成化学键外,也可以通过简单的物理吸附实现,使 AuNP 比色法更加简单实用。通常在以柠檬酸盐为还原剂合成的 AuNP 溶胶中, AuNP 表面包围着大量柠檬酸根负离子,构成 AuNP 溶胶粒子的荷负电特性。AuNP 粒子间的静电斥力大于范德华力,使 AuNP 溶胶可以稳定存在。Li 等^[21, 22] 通过研究发现 ssDNA 与 dsDNA 在这种荷负电 AuNP 表面有不同的吸附倾向。众所周知, DNA 分子因磷酸盐骨架的存在而带有大量负电荷。dsDNA 具有规则的双螺旋结构,其表面负电荷分布均匀且电荷密度较高,不能吸附到带有相同电荷的 AuNP 表面。ssDNA 则不同,其结构可随意扭曲地暴露于 AuNP 溶胶中,分子中磷酸盐骨架的另一侧含氮碱基可与 AuNP 产生较强的协同配位作用而吸附到 AuNP 表面^[23, 24], 这使 AuNP 表面的静电斥力增大而更加稳定,甚至在高浓度 NaCl 存在时也不易发生聚集。根据这一发现可以发展一种简易灵敏的分析技术,当向 ssDNA-AuNP 体系中加入某种靶标分析物 A,且 A 能与 ssDNA 特异性结合而导致 ssDNA 构象变为复杂构象(如发夹状、G 四分体等结构),使其电荷密度陡然增大,从而远离 AuNP 表面,导致 AuNP 暴露于高浓度 NaCl 发生聚集;反之亦然(图 2)。据此,可以异常简便地检测靶标分子凝血酶,同时检出限降至 0.83 nM^[24]。与传统方法相比,该类方法应用于蛋白质分子检测具有明显优势,如所需药品和材料均可以廉价获得,避免了生物分析中频繁的修饰和分离,这不仅保证了适配体的原始构象和对靶标分子的亲和性,还极大地简化了分析检测过程。相信这种方法将以其高灵敏、低成本和较简便等优势在生物检测及医学分析等领域得到广泛应用。

2.1.2 金属离子

基于适配体和纳米粒子特性的金属离子检测研

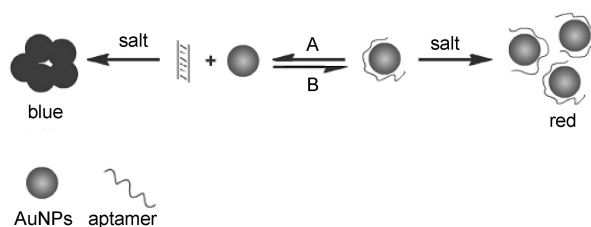


图 2 基于适配体结构转变的 AuNP 比色传感机理。其中分析物 A 与 ssDNA 结合诱导 ssDNA 构象变为 dsDNA, 而分析物 B 可诱导 dsDNA 构象变为 ssDNA

Fig 2 Structure-switching DNA-based colorimetric sensing mechanism using AuNPs. Note that the binding with the added analyte A causes conformational change of ssDNA to dsDNA while the analyte B leads to a contrary process

究方兴未艾,并由于其高灵敏度和高选择性引起了研究者的兴趣。 K^+ 作为一种具有多重生物功能^[25]的金属离子,可以通过适配体和纳米粒子的结合进行比色检测^[23]。向含有适量自由适配体的 AuNP 溶胶中加入 K^+ 后,与 K^+ 特异性结合的适配体空间结构将被诱导改变为 G 四分体的特殊三维结构。这种结构改变导致 AuNP 在高浓度 NaCl 存在时得不到自由适配体的“保护”而发生聚集。采用这种检测方法,肉眼可观察到 1mM K^+ 导致的 AuNP 颜色变化,且高浓度的 Li^+ 、 Na^+ 、 Rb^+ 、 NH_4^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等同类离子不影响 K^+ 的检测,可满足医学检测的需要。 Hg^{2+} 作为危害最大、最普遍的重金属离子之一,其分析和检测一直受到环境分析化学领域研究者的关注。传统 Hg^{2+} 检测技术采用原子吸收/发射光谱(AAS/AES)、电感耦合等离子质谱(ICP-MS)等昂贵仪器分析方法,难以满足当前日益增长的环境监测要求。将适配体应用于 Hg^{2+} 检测不失为一种重要的尝试。适配体与 AuNP 结合用于 Hg^{2+} 分析检测集中了诸多方法的优势,即简便、灵敏以及高的选择性。Lee 等^[26] 以适配体修饰的 AuNP 成功实现了对 Hg^{2+} 的比色检测。室温下,分别以两种不同序列 ssDNA (注:两 ssDNA 除一对碱基 T-T 错配,其他碱基序列互补)修饰的 AuNP 溶胶中, AuNP 由于 DNA 碱基序列互补杂交而发生聚集,溶胶颜色显示为紫色。当除 Hg^{2+} 外的其他金属离子存在(或空白实验)时,升高温度至 46 °C,杂交的 DNA 即解螺旋, AuNP 溶胶恢复红色;而当 Hg^{2+} 存在时,由于 Hg^{2+} 与杂交的 DNA 包含的 T 碱基对之间独有的 J 耦合作用^[3]强于配对碱基, DNA 解旋即 AuNP 簇的解聚需要更高的温度,这显示了 DNA-

AuNP对 Hg^{2+} 的高选择性。在 Ag增强的颜色变化基础上,将基于芯片的 DNA 检测扫描测量方法应用于 Hg^{2+} 的定量分析,其灵敏度也由之前的 100nM 提高至 10nM^[27],为快速、高通量分析检测提供了便利。Lee等^[28]还基于适当温度下半胱氨酸分子与 Hg^{2+} 特异性结合的特征,将 Hg^{2+} “移出” Hg^{2+} -DNA 适配体分子杂交网络结构,使纳米金粒子解聚。据此实现了对半胱氨酸的测定,其检出限为 100nM,其他氨基酸分子对检测不构成明显干扰。基于 ssDNA 吸附在 AuNP表面可以阻止 NaCl引起溶胶聚集的特性,Li等^[29]设计了对 Hg^{2+} 具有特异识别性能的更为高效的 DNA 适配体序列和简便的检测步骤。加入 Hg^{2+} 以后,适配体由伸展结构转变为发夹状,致使 AuNP发生聚集。这种方法无需繁琐的纳米修饰,保持了适配体的高效识别功能,检出限可达 10nM,达到美国 EPA 规定的饮用水 Hg^{2+} 含量的上限。类似地,Liu等^[30]设计了聚适配体序列 (T_n)用以识别 Hg^{2+} ,并对影响检测结果的诸多因素做了考察。上述简便、灵敏的检测方法无疑可以延伸至其他环境污染物的分析研究中。

同样由 SELEX 技术获得的核酶 (ribozyme) —— DNA 核酶 (DNAzyme) 和 RNA 核酶 (RNAzyme) 的出现为适配体分子识别提供了新的作用模式。核酶兼具高效催化活性和特异序列识别功能,可在氨基酸、金属离子等辅酶因子存在时发挥对 DNA 或 RNA 的切割、连接或修饰功能,因此可用于氨基酸、金属离子等的检测。Liu等^[31]设计了适配体与 DNA 核酶的作用模型,并首次将适配体核酶 (aptazymes) 应用于 Pb^{2+} 的检测中。核酶由一条酶链和核酶靶链组成。酶链中间部分碱基与底链错配或自杂交,底链中部含有一裂点。经延长的底链序列可以分别和修饰于 AuNP 表面的适配体单链杂交,AuNP 显聚集态;而在适当条件下, Pb^{2+} 会诱导适配体空间结构改变,进而激活核酶活性,使其选择性地裂断内切核酶靶链,AuNP 互相远离,最终使纳米簇解离。根据反应前后的颜色变化,可以实现对 Pb^{2+} 的检测。进一步的研究表明,核酶靶链与适配体“尾对尾”杂交方式对 Pb^{2+} 的存在感应最为灵敏^[32];同时,加入对核酶靶链具有进攻性的短链 DNA 将使整个反应过程加速。这种 Pb^{2+} 比色分析法不但解决了金属离子分析最棘手的选择性问题,而且灵敏度也高达 0.1 μ M。最近,他们还基于 dsDNA 和 ssDNA 的不同吸附性质,采用免标记的 AuNP 溶胶实现了对 Pb^{2+} 的检测^[33]。该方法不仅简易,而且灵敏度

提高至 3nM,检出限低于 EPA 规定的饮用水 Pb^{2+} 含量的上限 (72nM)。放射性元素铀的水溶态常以铀酰根离子 (UO_2^{2+}) 形式存在,对人类的健康具有潜在的重大危害。Lee等^[34]报道了基于适配体核酶-AuNPs 比色传感检测 UO_2^{2+} 的两种方法——标记法和免标记法,其检出限分别为 50nM 和 1nM,均低于 EPA 规定的 UO_2^{2+} 在污染物中的含量上限 (130nM)。此外, Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 等离子的适配体检测法也有报道^[35, 36]。预计用于检测其他重要金属离子的类似比色传感器将很快得到重视和研发。

2.1.3 有机小分子

适配体-纳米粒子探针的高亲和性和选择性对识别检测某些有机小分子同样有效。Liu等^[37]基于对 Pb^{2+} 的适配体-纳米比色传感器的研究,设计了一种操作简便、价格低廉、反应快速的腺苷和可卡因比色传感器,为其他靶标分子传感器提供了评价标准和设计模式。在设计 3 条适配体序列 3 Adap_{Au}、5 Adap_{Au} 和 Linke_{R_{dap}} 中,3 Adap_{Au} 的 3 端与 5 Adap_{Au} 的 5 端被标记 AuNP;当靶标分子不存在时,3 Adap_{Au} 和 5 Adap_{Au} 通过与含有适配体序列的 Linke_{R_{dap}} 分别互补而连接,导致 AuNP 溶胶交联聚集成簇而呈蓝紫色;而当靶标分子存在时,靶标分子将与适配体特异性结合,使得适配体空间结构发生改变,破坏了 5 Adap_{Au} 与适配体序列互补,金纳米簇解聚,AuNP 溶胶呈现红色。用肉眼可观察到 2mM 腺苷或 1mM 可卡因存在时产生的颜色变化。该类腺苷和可卡因的比色传感器的检出限分别为 0.3mM 和 50 μ M。在此基础上,利用适配体纳米结构的侧向流动 (lateral flow) 分离特性以减弱背景颜色,可以大大提高该类比色传感器的检测灵敏度^[38]。该技术已经被成功用于检测人类血清样品中的腺苷和可卡因,对腺苷和可卡因的检出限分别为 20 μ M 和 10 μ M。这种基于适配体-AuNP 的快速性或半定量的比色传感器可以像验孕棒一样用于制作试剂盒,使用极其方便。

Zhao等^[39]设计与上述颜色变化趋势相反的比色传感技术。首先,将 5 端标记有巯基的核苷酸短链用于修饰 AuNP;随后,靶标分子适配体的一端与上述核苷酸短链高效率杂交,AuNP 之间因更强的静电排斥力而更加稳定。在适当盐浓度下,靶标分子腺苷与适配体特异性结合并诱导适配体与核苷酸短链去杂交并脱离 AuNP 表面,使 AuNP 发生聚集,AuNP 溶胶由红色变为紫色。这种设计比前面所述的交联 AuNP 检测靶分子的方法更具优势。交

联 AuNP 溶胶因聚集成簇, 储存时易造成聚沉; 靶标分子由于位阻等作用难以与簇内纳米粒子表面的大量适配体结合; 为达到最佳检测性能, 检测过程中某些时候需要加热至临近纳米簇的“融化解聚”温度, 难以满足实际分析检测的需要; 而且, 这种方法的灵敏度更高, 对腺苷的检出限为 $10\mu\text{M}$ 。基于类似原理和硅纳米粒子 (silica nanoparticle, SNP) 性质的三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 荧光检测法也有报道^[40]。最近, Zhao 等^[41]进一步简化了检测过程, 采用由腺苷适配体修饰的 AuNP 成功实现了对腺苷的灵敏检测。AuNP 被腺苷适配体修饰后由于静电排斥力而保持稳定, 在高浓度盐存在时, AuNP 溶胶发生聚集, 颜色由红色变为紫色; 若继续加入腺苷, 呈自由伸展形态的适配体与腺苷结合形成折叠结构, 电荷密度升高, 使 AuNP 簇解聚, 颜色又转为红色。这一过程可用于对腺苷的检测, 其检测范围为 $20\text{—}2\ 000\mu\text{M}$ 。若适当条件下, 继续加入腺苷脱氢酶, 腺苷将被酶解为次黄苷, 失去与腺苷适配体的结合力进而再次使得 AuNP 溶胶呈紫色聚集态。此过程可实现对腺苷脱氢酶的识别。研究证明, 这种方法同样适用于对 K^+ 等其他靶物质的检测。这一新的比色设计和检测方法, 不仅加深了对适配体复杂结构及其性质的研究, 而且对传统胶体理论也有补充说明作用。Chen 等^[42]基于类似原理, 对 ATP 进行了检测, 并将灵敏度提高至 10 nM 。这一比色传感器在 ATP 类似物 (三磷酸鸟苷 GTP, 三磷酸胞苷 CTP 和三磷酸尿苷 UTP) 中只对 ATP 响应, 而对腺苷及其磷酸化衍生物 (单磷酸腺苷 AMP, 二磷酸腺苷 ADP) 的响应程度类似。将其应用于对真实尿样中腺苷的分析检测, 结果令人满意。

Wang 等^[43]和 Zhang 等^[44]采用无任何化学修饰的 AuNP 分别实现了对 ATP 和可卡因的检测。在对 ATP 的检测中, 将含 ATP 适配体的 dDNA 加入 AuNP 溶胶中, 在 NaCl 存在时, AuNP 溶胶发生聚集; 而当靶标分子 ATP 存在时, ATP 适配体特异识别 ATP 而使 dDNA 解旋, AuNP 簇解聚。这一 ATP 适配体纳米比色传感器的检出限为 $0.6\mu\text{M}$ 。在对可卡因的检测中, 设计的可卡因适配体 (ACA1, ACA2) 可与可卡因特异性结合。当产物加入 AuNP 溶胶并有一定量 NaCl 存在时, AuNP 溶胶发生聚集; 而在空白或其他分析物和一定量 NaCl 存在时, 可卡因适配体空间结构保持自由伸展, AuNP 溶胶可以稳定存在。该可卡因比色检测法不仅操作简单, 灵敏度也很高。其视觉观测可以达到 $20\mu\text{M}$, 检

出限为 $2\mu\text{M}$, 与可卡因的荧光和电化学检测灵敏度相当。

基于适配体和纳米材料的比色传感技术在生物大分子、金属离子和有机小分子等分析研究领域发展迅速, 并继续向其他相关研究领域延伸。该技术具有选择性高、成本低、易操作、反应快等优点, 许多传感器可以像石蕊试纸实现定性检测, 能够很好地满足现代分析技术对现场快速检测的需求, 这对生物分析、环境及公共安全监测和医疗诊断等分析研究者是一个巨大的鼓舞。如今某些传感器已经面向市场或正在商品化, 具有广阔的应用前景。但是, 比色法往往只适于实时定性或半定量分析, 灵敏度相对较低。在这类传感器得到广泛研究和实际应用的背景下, 研究者逐渐将目光转向其他分析检测手段的研究中。

2.2 荧光法

荧光法是适配体纳米粒子探针研究中普遍采用的光学检测方法。与比色法相比, 由于荧光法具有灵敏度高、特性参数多和动态范围宽的特点, 且荧光检测技术中适配体与纳米粒子的作用方式灵活多样, 因此相比比色法更具发展潜力。荧光检测技术中, 荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 技术是研究液态环境中生物分子相互作用的有力工具^[45-47]。FRET 是一种非辐射跃迁, FRET 中供体激发态能量是以非辐射的分子间电偶极相互作用方式转移到受体激发态, 受体可以发射强于本身的增强荧光 (敏化荧光), 也可以不发荧光 (荧光猝灭), 同时伴随荧光寿命的相应缩短或延长。利用适配体与靶物质结合前后伴随结构转变的特点, 可以采用 FRET 技术实现高效分析与传感。由于影响 FRET 效率的多种问题, 例如染料自身性质、供体与受体染料分子间距和染料分子间相互作用等, 尚未得到很好的解决, 目前对适配体进行荧光染料分子供体-受体双标记所取得的进展并不大。近年来, 纳米材料光学特性的深入研究为这一难题提供了解决方案。比如, 作为受体的 AuNP, 在“荧光染料-AuNP”供体-受体对中的 Stem-Volmer 猝灭常数较普通猝灭剂要大几个数量级, 因而 AuNP 在 FRET 的研究中得到广泛应用。

Huang 等^[48]在比色法检测 PDGF 的基础上, 发展了对 PDGF 的荧光检测法。他们将具有化学亲和性的荧光团 DMDAP (*N,N*-dimethyl-2, 7-diazapyrenium dication, $\lambda_{\text{ex/em}} = 335/424\text{ nm}$) 加入由适量 PDGF 适配体修饰的 AuNP 溶胶中, DMDAP

荧光发射被 AuNP 猝灭;而目标分子 PDGF 的加入将诱导适配体结构变化并将 DMDAP 释放到溶液中, DMDAP 荧光得以恢复, 以此实现了 PDGF 的荧光法检测。该法对 PDGF-AA 的检出限低至 8 pM。此外, 向荧光增强的体系中加入 PDGFR, 因竞争反应可实现对 PDGFR 的检测, 对 PDGFR- 检出限为 0.25 nM。采用类似的方法, 他们还还对 Hg^{2+} 进行了荧光法检测^[49]。通过控制 AuNP 表面适配体的最佳覆盖密度, 对 Hg^{2+} 浓度检测范围为 0.05—2.5 μ M, 检出限为 25 nM, 灵敏度远高于比色法。利用金纳米点 (gold nanodot, AuND) 的荧光特性与 AuNP 的猝灭特性结合可以在不使用任何染料的情况下实现 FRET 检测^[50]。利用 PDGF 修饰的 AuND 和 PDGF 适配体修饰的 AuNP 作为一对 FRET 供体/受体对, 供体/受体对依靠 PDGF 和 PDGF 适配体之间强相互作用互相接近, 以实现 FRET 效应即荧光猝灭。加入 PDGF 或 PDGFR- 后导致竞争反应, AuND 与 AuNP 互相远离, 荧光强度升高。该法对 PDGF 和 PDGFR- 的检出限均达 pM 水平, 且在除去杂质的荧光背景后, 对人的实际血清样品中 PDGF 的检出限为 10 pM。

Wang 等^[51]以凝血酶为靶标, 依据 AuNP 的荧光猝灭特性以及适配体与靶标分子结合前后空间结构的变化, 设计并验证了荧光法检测的 3 个一般策略 (如图 3 所示)。凝血酶与修饰适配体分别以键合、杂交和吸附的方式与 AuNP 连接或毗邻, 可以分别得到 (a) Ap-In-AuNPs, (b) Ap-Hy-AuNPs 和 (c) Ap-Ad-AuNPs 3 种凝血酶荧光探针。3 种探针均可获得极低的荧光背景, 凝血酶的加入会导致荧光信号不同程度的恢复, 因而可分别建立灵敏的分析方法。其检测机理分别为: (a) 凝血酶适配体 P1 修饰于 AuNP 表面并与 T1 杂交, 使标记 T1 的荧光团的荧光被 AuNP 猝灭。加入的凝血酶与 P1 特异结合, 使 T1 远离 AuNP, 荧光恢复; (b) P2 修饰于 AuNP 表面并与标记有荧光团的凝血酶适配体 T2 杂交, 荧光被 AuNP 猝灭。凝血酶与 T2 的结合使 T2 释放到溶液中, 荧光恢复; (c) 荧光团标记的凝血酶适配体吸附到 AuNP 表面, 荧光被猝灭。凝血酶与适配体结合后使适配体转变为 G-四分体构象并远离 AuNP 表面, 荧光得到恢复。实验表明, 在 (a) 法和 (b) 法中, AuNP 的修饰及 DNA 杂交相对均一, 其对凝血酶的检出限分别为 0.14 nM 和 3.78 nM; (c) 法由于无需 AuNP 修饰和 DNA 杂交, 方法简易快捷, 但存在吸附过程不均一导致的吸

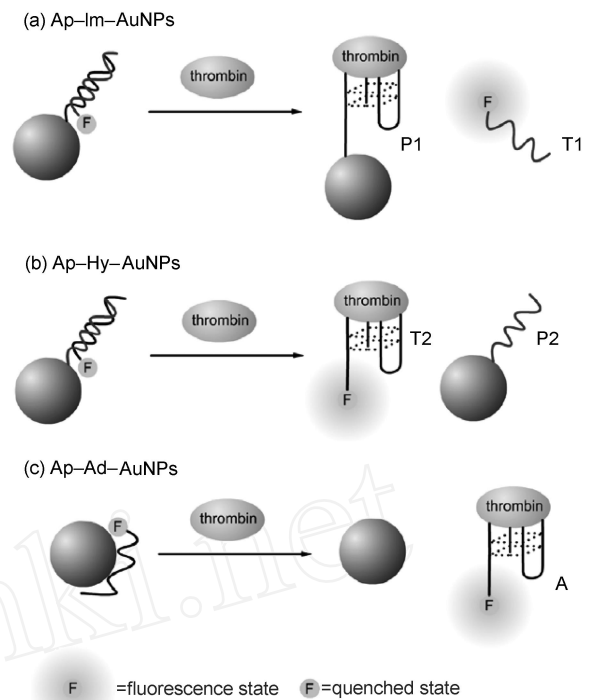


图 3 分别以 (a) Ap-In-AuNPs, (b) Ap-Hy-AuNPs 和 (c) Ap-Ad-AuNPs 检测凝血酶的示意图^[51]

Fig 3 Principle of thrombin detection with (a) Ap-In-AuNPs, (b) Ap-Hy-AuNPs and (c) Ap-Ad-AuNPs^[51]

附平衡常数及脱附速率常数分布较宽等问题, 荧光强度恢复较弱, 其检出限为 3.5 nM。(a) 法中的凝血酶与适配体结合的亲和势最大, 因而最灵敏。(c) 法也已用于设计 Hg^{2+} 的荧光适配体传感器^[52]。最近, Yang 等^[53]将碳纳米管 (carbon nanotube, CNT) 的荧光猝灭性质应用于核酸和蛋白质分析过程中, 检测凝血酶的动态响应范围为 4.0—150 nM, 检出限为 1.8 nM, 证实了具有荧光猝灭性质的 CNT 在这一领域的应用潜力。

Huang 等^[54]以电子束蒸镀法 (E-beam evaporation) 在 SiO_2 基底上制备了金纳米线 (gold nanowire, AuNW), 并将巯基标记的凝血酶适配体修饰在 AuNW 表面, 用于凝血酶分子的检测。适配体特异识别生物素酰化的凝血酶分子后, 产物与标记有荧光团 Alexa Fluor 546 的抗生物素蛋白链菌素 (Alexa Fluor 546-labeled streptavidin) 反应, 最终在 AuNW 上形成带有负电荷的探针-靶标信号分子 (probe-target-reporter, PTR) 复合结构。若在 AuNW 上施加 0.5 Hz 的低频交流方波电场, 当 AuNW 线带有负电

势时, PTR 复合结构受到静电排斥, 信号分子在 AuNW 表面等离子共振的增强下显示出高强度荧光; 当 AuNW 带有正电势时, PTR 复合结构吸附到 AuNW 表面, 信号分子由于表面能量转移荧光消失。可以调控信号分子荧光变化的频率与低频电场频率保持一致。在极弱的 AuNW 荧光背景下, 该法可检测 100pM 的凝血酶。通过对待测荧光信号的同步共振技术, 可以线性响应范围为 100M—100nM 凝血酶, 检出限为 100M。该荧光分析法对凝血酶的检测灵敏度优于以往报道的各种方法。

适配体 纳米粒子荧光探针作为药物用于癌细胞诊断和治疗已经较为普遍。Huang 等^[55]以金纳米棒 (gold nanorod, AuNR) 为“种子”生长合成出金 银纳米棒 (Au-Ag NR, 长 (56 ±7) nm, 宽 (12 ±3) nm, 横向和纵向的吸收波长分别为 509nm 和 827nm)。Au-Ag NR 的表面首先覆盖巯基烷烃和巯基聚乙二醇 (SH-PEG), 然后修饰 TAMRA 标记的 CCRF-CEM 细胞适配体。实验表明, 该功能性 Au-Ag NR 表面的适配体分子对 CCRF-CEM 靶标细胞的亲和性是单适配体分子的 26 倍, 而对 Ramos 细胞则无特异识别性。其后, 他们利用具有吸收近红外光并转化为热这一特性的 Au-Ag NR (长 (53 ±7) nm, 宽 (14 ±2) nm, 横向和纵向的吸收波长分别为 513nm 和 800nm), 结合适配体识别和定位靶标的特性, 应用于 CCRF-CEM 癌细胞的光热治疗^[56]。在激光 (λ = 808nm, 600mW) 照射下, Au-Ag NR 将吸收的激光能量短时间内转化为热释放, 引起癌细胞大量死亡, 死亡率达 (93 ±11)%, 而空白细胞的死亡率则只有 (5 ±1)%。这些结果表明该适配体修饰的纳米棒具有高选择性识别和杀死癌细胞的功能。

量子点 (quantum dot, QD) 材料在 3 个维度的尺寸都小于 100nm, 其内部电子受到显著的量子局限效应不能自由运动, 因此能量在 3 个方向上都是量子化的。在解决了水溶性和生物相容性的问题之后^[57, 58], QD 在生物医学分析等领域的应用才迅速成为研究的热点。与传统荧光染料相比, QD 荧光探针具有稳定性好、量子产率高、荧光寿命长和发射光谱峰窄等特点。Levy 等^[59]设计了 streptavidin-coated QD525 (量子点荧光供体) 和 Eclipse (荧光猝灭分子) 分别作为 FRET 的供体和受体, 将其应用于蛋白质凝血酶的检测。5 端被生物素酰化的凝血酶适配体首先与较短的 3 端标记有 Eclipse 分子的互补核苷酸链杂交后, 用于修饰 streptavidin-coated

QD525, 则 QD 荧光被有效猝灭; 在适当条件下, 与凝血酶适配体完全互补的核苷酸单链或凝血酶均可与适配体特异性结合, 使标记有 Eclipse 分子的核苷酸短链与凝血酶适配体去杂交, 并释放到溶液中, QD 的荧光得以恢复。这是 QD 在 FRET 用于核酸和蛋白质检测研究中的一次有益尝试。Choi 等^[60]通过简易方法合成了凝血酶适配体修饰的 QD (PbS, $r_{\text{em}} = 1.050\text{nm}$), 加入靶标分子凝血酶后, QD 荧光强度随凝血酶浓度增加而依次降低。由于凝血酶只吸收紫外光, 故可排除 FRET 发生的可能性。其工作机理被认为是, QD 与适配体结合后, QD 与凝血酶的某些官能团 (如胺基) 之间发生电子转移, 从而导致 QD 的吸光度和荧光强度减弱。这种免标记凝血酶荧光检测法检测线性范围在 1—30nM, 检出限为 1nM。

QD 用于癌细胞影像技术进行检测诊断一直是生物医学研究的热点, QD 与适配体的结合则大大提高了其在细胞研究领域的功能。Chen 等^[61]将对肌腱蛋白有特异识别性的 GB F10 适配体修饰于 QD 表面, 成功地应用于对表达此蛋白的神经胶质瘤细胞的寻靶定位和影像, 结果显示了 QD 较好的抗光漂白性以及适配体优于抗体蛋白质的抗失活性及高效选择性。阿霉素 (doxorubicin, Dox) 是一种带有荧光的抗肿瘤药物, 可以以嵌入作用方式与 RNA 或 DNA 形成的双链 CG 序列结合。以 QD 为载体, 适配体可作为定位靶标的功能分子^[62]。据此, Bagalkot 等^[63]发展了由 Dox 适配体和 CdSe/ZnS 量子点组成的双 FRET 体系, 并将其成功地应用于体外前列腺癌细胞的影像、治疗及药物输送。首先, 将前列腺特异膜蛋白抗原 (prostate specific membrane antigen, PSMA) A10 PSMA 适配体修饰于 QD 表面形成 QD-Apt 耦联物; 然后, 向此耦联物中加入 Dox 形成 QD-Apt(Dox), 逐渐提高 Dox 浓度, 可以观察到 QD 荧光强度依次减弱; 若保持 Dox 浓度一定, 逐步提高 QD-Apt 耦联物浓度, Dox 荧光强度依次降低。这些现象证明, QD、适配体和 Dox 三者之间, QD 作为能量供体, 将能量转移至 Dox (产生荧光), 紧接着 Dox 将能量转移至适配体 (荧光猝灭), 从而形成了两个顺序 FRET 供受体对。在 37℃ 下, 将 QD-Apt (Dox) 分别与前列腺癌细胞系 LNCaP 和 PC3 培养 0.5h, 发现 QD-Apt(Dox) 只有效吸附于表达 PSMA 的 LNCaP 细胞系内, 证实了适配体的高效选择性。为检验该体系的灵敏度, 运用共焦激光扫描显微镜观察 QD-Apt(Dox) 与 LNCaP 细胞系的荧光影像, 可

以观察到,在培养之初,QD和Dox的荧光均微弱,处于猝灭态;1.5h后,由于LNCaP细胞内各种酶对PSMA适配体的生物降解作用,耦联体解离,Dox得到释放,因此QD和Dox均显示出较强的荧光。这表明QD-Apt(Dox)荧光的背景噪声低,可用于体外单细胞影像。关于Dox对肿瘤细胞的疗效,通过对LNCaP细胞和PC3细胞与QD-Apt(Dox)培养3h后的存活率考察,发现LNCaP只有(52.5 ± 1.6)%,而PC3细胞存活率为(77.2 ± 3.1)%。对比实验发现,单独QD或适配体对两种细胞均无副作用,单独Dox对两种细胞副作用大小类似。因此,通过QD-Apt(Dox)这一双FRET体系,可以同时实现靶细胞定位、治疗以及药物输送。显然,这种基于适配体和量子点的细胞影像及药物输送技术对生物医学的研究具有重要实用价值。

基于适配体特异识别和纳米技术的荧光传感技术具有巨大的发展潜力。多种纳米材料技术的使用以及荧光检测法固有的高灵敏度等特性,使得适配体-纳米探针技术在环境分析、生物学分析等痕量传感分析领域有了更大的应用空间。有理由相信这一领域的研究将会得到越来越多的关注。

2.3 表面增强拉曼光谱法

拉曼光谱是指光通过介质时,入射光子和分子相互碰撞,分子的振动、转动能量和光子能量叠加,因频率发生变化而产生的散射光谱。但拉曼散射光强度仅约为入射光强的 10^{-10} ,要对表面吸附物种进行拉曼光谱研究几乎都需要贵金属(金、银和过渡金属元素等)界面的某种增强效应,如粗糙金属表面和纳米粒子表面等,这就是SERS。SERS自发现后,很快在分析科学、生命科学和纳米材料科学等相关领域得到广泛研究和应用^[64-66]。一定条件下,SERS增强因子可达14—15个数量级^[67],灵敏度可与荧光相当,可用于研究分子水平的信息。

SERS保留了拉曼光谱的优点,即可以作为获取物质分子结构信息和对物质定性的工具,同时又可以实现高灵敏度定量分析。较之荧光光谱,物质的拉曼散射光谱谱峰狭窄且丰富,逐渐发展成为极为重要的高灵敏度分析技术,在食品及环境污染物检测领域吸引了分析化学家的注意。近年来,利用金、银等纳米粒子,结合微流控技术,SERS在进行定性、定量分析方面取得了较大进展^[64, 68, 69]。基于适配体结构变化特性和纳米粒子的SERS相结合,可以发展灵敏的探针分析技术。Wang等^[70]应用适配体SERS传感成功实现了对蛋白质凝血酶的检

测。将巯基化的凝血酶适配体键合到金基底表面,随后加入的凝血酶的一个活性位点与基底表面的适配体特异性结合,此时再加入表面修饰有罗丹明6G(R6G)和凝血酶适配体的AuNP(粒径为13nm),则AuNP表面的适配体与凝血酶的另一活性位点结合,形成“三明治”结构。13nm的AuNPs并无拉曼增强效应,而在AuNP周围沉积适量AgNP后,即可检测出R6G的SERS信号。这一凝血酶SERS检测法保持了凝血酶适配体的高度选择性,其检出限为0.5nM。但因R6G周围的AgNPs易产生不均一聚集,该研究并未得到R6G的SERS信号与凝血酶浓度的定量曲线。Fabris等^[71]合成了AgNP二聚体,以4,4'-二巯基联苯作为连接两个AgNP的拉曼信号分子,随后在AgNP二聚体表面修饰巯基标记的凝血酶适配体,以此作为检测凝血酶的SERS传感界面。采用凝血酶适配体和巯基十六烷酸修饰银基底,向基底表面加入目标分子凝血酶后,加入AgNP二聚体,即可实现对凝血酶的检测,检出限达100pM。Cho等^[72]则通过加入目标分子凝血酶来控制拉曼分子标记的适配体与SERS增强基底之间的距离,进而通过显示出的SERS信号差异实现了凝血酶高灵敏度检测。他们将5和3端分别标记有巯基和亚甲基蓝(methylene blue, MB)的凝血酶适配体通过物理和S-Au化学作用吸附至制备的AuNP基底上,作用一定时间后,加入目标分析物,凝血酶适配体可与凝血酶特异结合,转变为折叠构象。物理吸附至AuNP基底的凝血酶适配体远离AuNP基底,使MB的SERS信号强度降低;而化学吸附至AuNP表面的凝血酶适配体在凝血酶存在时仍维持一定的SERS强度。这一凝血酶SERS检测方法简易、选择性高且灵敏,检出限为100pM。

基于SERS适配体传感器分析有机小分子的研究较多。Chen等^[73]利用可卡因适配体与可卡因结合前后结构的变化对可卡因进行了SERS检测。首先,3端被标记四甲基罗丹明(tetramethylrhodamine, TMR)、5端修饰有巯基的可卡因适配体和3-巯基丙酸(3-mercaptopropionic acid, MPA)先后在纳米银基底形成自组装结构。此时适配体3端的TMR分子因适配体不规则热运动和基底的静电排斥远离AuNP表面,故在激光激发下产生较弱的SERS信号。目标分子可卡因的加入令适配体形成特定封闭结构,3端的TMR分子接近银基底表面,使SERS信号增强。以此建立的SERS可卡因适配体传感器选

择性高,检出限为 $1\mu\text{M}$,灵敏度高于可卡因的荧光和电化学传感器。在他们建立的以 SERS检测腺苷的方法中^[74],首先将腺苷适配体(32-mer)与 TMR 标记的互补 DNA(12-mer)通过杂交形成 dsDNA,目标分析物存在时可诱导双链解旋并与腺苷适配体特异结合,故 TMR 标记的 DNA 处于游离态。将反应后的产物加入到修饰有与 TMR 标记的 DNA 序列互补的 ssDNA 的纳米粒子(Ag-clad Au nanoparticles) SERS基底上后,发生 DNA 杂交,即标记分子 TMR 接近 SERS增强基底,产生 TMR 的 SERS信号。依据这一原理,可以实现对腺苷的 SERS高灵敏检测,检出限达 10nM 。这两种适配体 SERS传感器灵敏度远高于已报道的其他检测方法,且用于 SERS增强的纳米粒子基底经简单清洗均可重新使用,方便快捷。基于静电力的作用,他们还设计并实现了凝血酶 SERS高灵敏度检测^[75]。SERS基底采用 AuNP(粒径为 56nm)覆盖,随后巯基标记的凝血酶适配体被修饰到 SERS基底。经简单热处理,凝血酶适配体由自由的线状转变为发夹结构。目标蛋白质凝血酶不存在时,加入的拉曼活性分子结晶紫(crystal violet, CV)在适配体折叠结构阻碍下少量静电吸附到纳米基底,产生的 SERS信号较弱。凝血酶存在时,适配体与凝血酶的结合改变了其空间结构,弱化了对 CV 吸附的阻碍作用, SERS信号增强。基于 SERS对目标分子浓度及 CV 与基底间距的高度灵敏性,这一方法对凝血酶的检出限为 20pM ,检测的线性范围为 $0.1\text{—}10\text{nM}$ 。SERS检测重金属离子也一直是这一领域的难点。与阴离子相比,水溶液中的金属离子由于价态的多变表现出种类繁多和难以测定,因此实现 SERS对特定金属离子的测定相对困难。在借鉴了前人利用适配体的高亲和性比色法检测金属离子的基础上,王国庆等^[76]成功实现了 SERS技术高灵敏度、高选择性检测 Hg^{2+} 。将 TAMRA 染料标记的 Hg^{2+} 适配体加入到 AgNP 溶胶中,此时适配体因 N-Ag 强亲和性吸附至 AgNP 表面^[77],加入适量具有聚集修饰双重功能的精胺后,由于适配体的抗聚集作用, AgNP 出现轻度聚集,可检测到较弱的 SERS 信号。当加入 Hg^{2+} 后, AgNP 表面的 Hg^{2+} 适配体变为折叠构象,无法阻止 AgNP 聚集, SERS 信号因 AgNP 聚集度提高而增强。由此实现了 Hg^{2+} 的高灵敏度和高选择性检测,检出限可达 5nM ,低于已报道的比色、荧光分析技术。

3 结论与展望

基于适配体纳米粒子的光学传感技术操作简便、灵敏度高且选择性好,在生物大分子、金属离子和有机小分子检测等领域已得到广泛研究和普遍应用,展现了广阔的发展前景。基于 SELEX 筛选技术,多数物质都有对应的能够与其特异性结合的适配体序列。适配体的靶分子范围非常广泛,金属离子、有机分子、核酸、多肽、蛋白、细胞、细胞聚集、亚细胞器、大分子聚集物、新鲜分离到的整块组织或体外培养的组织等,理论上都可以通过 SELEX 技术筛选到其相应适配体。然而,大量有重要生物学意义的癌细胞标志蛋白和功能蛋白、功能小分子和离子等靶标适配体序列尚未筛选成功。随着 SELEX 筛选技术的不断发展完善,相信适配体筛选的效率和速度都将不断得到提高;随着纳米器件、纳米制剂等相关纳米技术的飞速发展,更多生物相容性好、低毒性的纳米材料和适配体相结合,有望进一步提高适配体传感器的实用性能。发展基于适配体探针分析技术的关键是如何将适配体的识别机理转变为可检测信号。除本文介绍的比色、荧光和表面增强拉曼等光学检测方法外,电化学、电化学发光、质谱和表面等离子共振等相关适配体传感器也被广泛研究和开发。寻求更多优势技术与适配体传感器结合,并方便地获取可检测信号无疑是这一领域发展的一个趋势。研究高灵敏、高通量、微型化和集约化的适配体传感分析技术也将是未来适配体分析化学发展的一个重要方向。商品化适配体传感器的研制和应用将被持续关注,例如生物医学诊断、药物输送、食品卫生、环境监测和公共安全等领域,都离不开适配体传感和纳米分析技术的支持协助。

参 考 文 献

- [1] Tuerk C, Gold L. *Science*, 1990, 249: 505—510
- [2] Ellington A D, Szostak J W. *Nature*, 1990, 346: 818—822
- [3] Tanaka Y, Oda S, Yamaguchi H, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129: 244—245
- [4] Stojanovic M N, de Prada P, Landry D W. *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123: 4928—4931
- [5] Kavakami J, Hirofumi I, Yukie Y, et al. *Inorg. Biochem.*, 2000, 82: 197—206
- [6] Medley C D, Smith J E, Tang Z W, et al. *Anal. Chem.*, 2008, 80: 1067—1072
- [7] Jayasena S D. *Clin. Chem.*, 1999, 45: 1628—1650
- [8] Song S, Wang L, Li J, et al. *Trend Anal. Chem.*, 2008, 27: 108—117
- [9] 谢海燕(Xie H Y),陈薛钗(Chen X C),邓玉林(Deng Y L). *化学进展(Progress in Chemistry)*, 2007, 19(6): 1026—1033
- [10] 吕凤婷(Lv F T),郑海荣(Zheng H R),房喻(Fang Y). *化学*

- 进展 (Progress in Chemistry), 2007, 19(2/3): 256—266
- [11] Banholzer M J, Millstone J E, Qin L, et al. *Chem. Soc. Rev.*, 2008, 37: 885—897
- [12] 漆红兰 (Qi H L), 李延 (Li Y), 李晓霞 (Li X X) 等. 化学传感器 (Chemical Sensors), 2007, 27(9): 1—8
- [13] 张艳丽 (Zhang Y L), 朱静 (Zhu J), 周敬良 (Zhou J L) 等. 化学传感器 (Chemical Sensors), 2008, 28(3): 1—6
- [14] 李一林 (Li Y L), 郭磊 (Guo L), 张朝阳 (Zhang C Y) 等. 中国科学 B 辑: 化学 (Science in China Series B: Chemistry), 2008, 38(1): 1—11
- [15] Elghanian R, Storhoff J J, Mucic R C, et al. *Science*, 1997, 277: 1078—1081
- [16] Pavlov V, Xiao Y, Shlyahovsky B, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126: 11768—11769
- [17] Wang Y L, Li D, Ren W, et al. *Chem. Commun.*, 2008, 2520—2522
- [18] Li Y Y, Zhang C, Li B S, et al. *Clin. Chem.*, 2007, 53(6): 1061—1066
- [19] Jana N R, Ying J Y. *Adv. Mater.*, 2008, 20: 430—434
- [20] Huang C C, Huang Y F, Cao Z, et al. *Anal. Chem.*, 2005, 77: 5735—5741
- [21] Li H, Rothberg L J. *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126: 10958—10961
- [22] Li H, Rothberg L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, 101: 14036—14039
- [23] Wang L, Liu X, Hu X, et al. *Chem. Commun.*, 2006, 3780—3782
- [24] Wei H, Li B, Li J, et al. *Chem. Commun.*, 2007, 3735—3737
- [25] Kofuji P, Newman E A. *Neuroscience*, 2004, 129: 1045—1056
- [26] Lee J S, Han M S, Mirkin C A. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2007, 46: 4093—4096
- [27] Lee J S, Mirkin C A. *Anal. Chem.*, 2008, 80: 6805—6808
- [28] Lee J S, Umann P A, Han M S, et al. *Nano Lett.*, 2008, 8(2): 529—533
- [29] Li D, Wieckowska A, Willner I. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008, 47: 3927—3931
- [30] Liu C W, Hsieh Y T, Huang C C, et al. *Chem. Commun.*, 2008, 2242—2244
- [31] Liu J, Lu Y. *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125: 6642—6643
- [32] Liu J, Lu Y. *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127: 12677—12683
- [33] Wang Z D, Lee J H, Lu Y. *Adv. Mater.*, 2008, 20: 3263—3267
- [34] Lee J H, Wang Z, Liu J, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130: 14217—14266
- [35] Cuenoud B, Szostak J W. *Nature*, 1995, 375: 611—614
- [36] Li J, Zheng W, Kwon A, et al. *Nucleic Acid Res.*, 2000, 28: 481—488
- [37] Liu J W, Lu Y. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, 45: 90—94
- [38] Liu J, Mazumdar D, Lu Y. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, 45: 7955—7959
- [39] Zhao W, Chiuman W, Brook M A, et al. *ChemBioChem*, 2007, 8: 727—731
- [40] Wang Y, Wang Y, Liu B. *Nanotechnology*, 2008, 19: art. no. 415605
- [41] Zhao W, Chiuman W, Lam J C F, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130: 3610—3618
- [42] Chen S J, Huang Y F, Huang C C, et al. *Biosens. Bioelectron.*, 2008, 23: 1749—1753
- [43] Wang J, Wang L, Liu X, et al. *Adv. Mater.*, 2007, 19: 3943—3946
- [44] Zhang J, Wang L, Pan D, et al. *Small*, 2008, 4: 1196—1200
- [45] Kim S, Chen L, Lee S, et al. *Anal. Sci.*, 2007, 23: 401—405
- [46] Jung J, Chen L, Lee S, et al. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, 387: 2609—2615
- [47] Chen L, Lee S, Lee M, et al. *Biosens. Bioelectron.*, 2008, 23: 1878—1882
- [48] Huang C C, Chiu S H, Huang Y F, et al. *Anal. Chem.*, 2007, 79: 4798—4804
- [49] Liu C W, Huang C C, Chang H T. *Langmuir*, 2008, 24: 8346—8350
- [50] Huang C C, Chiang C K, Lin Z H, et al. *Anal. Chem.*, 2008, 80: 1497—1504
- [51] Wang W J, Chen C L, Qian M X, et al. *Anal. Biochem.*, 2008, 373: 213—219
- [52] Wang H, Wang Y, Jin J, et al. *Anal. Chem.*, 2008, 80: 9021—9028
- [53] Yang R H, Tang Z W, Yan J L, et al. *Anal. Chem.*, 2008, 80: 7408—7413
- [54] Huang S X, Chen Y. *Nano Lett.*, 2008, 8: 4210—4216
- [55] Huang Y F, Chang H T, Tan W H. *Anal. Chem.*, 2008, 80: 567—572
- [56] Huang Y F, Sefah K, Bamrungsap S, et al. *Langmuir*, 2008, 24: 11860—11865
- [57] Bruchez M Jr, Moran M, Gin P, et al. *Science*, 1998, 281: 2013—2016
- [58] Chan W C, Nie S. *Science*, 1998, 281: 2016—2018
- [59] Levy M, Cater S F, Ellington A D. *ChemBioChem*, 2005, 6: 2163—2166
- [60] Choi J H, Chen K H, Strano M S. *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128: 15584—15585
- [61] Chen X C, Deng Y L, Pang D W, et al. *Nanotechnology*, 2008, 19: art. no. 235105
- [62] Chu T C, Shieh F, Lavery L A, et al. *Biosens. Bioelectron.*, 2006, 21: 1859—1866
- [63] Bagalkot V, Zhang L F, Levy - Nissenbaum E, et al. *Nano Lett.*, 2007, 7: 3065—3070
- [64] Chen L, Choo J. *Electrophoresis*, 2008, 29: 1815—1828
- [65] Qian X M, Nie S M. *Chem. Soc. Rev.*, 2008, 37: 912—920
- [66] Wu D Y, Li J F, Ren B, et al. *Chem. Soc. Rev.*, 2008, 37: 1025—1041
- [67] Nie S, Emory S R. *Science*, 1997, 275: 1102—1106
- [68] Lee S, Choi J, Chen L, et al. *Anal. Chim. Acta*, 2007, 590: 139—144
- [69] Bell S E J, Sirimuthu N M S. *Chem. Soc. Rev.*, 2008, 37: 1012—1024
- [70] Wang Y, Wei H, Li B, et al. *Chem. Commun.*, 2007, 5220—5222
- [71] Fabris L, Dante M, Nguyen T Q, et al. *Adv. Funct. Mater.*, 2008, 18: 2518—2525
- [72] Cho H, Baker B R, Wachsmann-Hogiu S, et al. *Nano Lett.*, 2008, 8: 4386—4390
- [73] Chen J, Jiang J, Gao X, et al. *Chem. Eur. J.*, 2008, 14: 8374—8382
- [74] Chen J W, Liu X P, Feng K J, et al. *Biosens. Bioelectron.*, 2008, 24: 66—71
- [75] Hu J, Zheng P C, Jiang J H, et al. *Anal. Chem.*, 2009, 81: 87—93
- [76] 王国庆 (Wang G Q), 陈令新 (Chen L X). 第十七届全国色谱学术报告会及仪器展览会 (17th National Symposia and Exhibition on Chromatography). 2009. 4. 19-21 (April 19—21, 2009, Changsha, China)
- [77] Nath S, Ghosh S K, Kundu S, et al. *J. Nanopart. Res.*, 2006, 8: 111—116