

基于磁珠分离的酶联适配体检测痕量蛋白质的新型比色分析方法

申睿, 唐吉军, 张朝阳, 郭磊, 谢剑炜
(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要 以核酸适配体作为高效专一的识别/传感元件, 构建了一种新型的磁性分离和特异性捕获的检测方法. 两个适配体通过简单的生物素化修饰, 利用其与凝血酶不同位点的高亲和力形成夹心结构, 其中连接适配体的磁珠可捕获蛋白质, 加入另一个适配体及链霉亲和素标记的辣根过氧化物酶后, 通过比色法实现靶蛋白检测. 该法操作简单, 分析时间短, 对凝血酶的线性响应范围为 10 ~ 80 nmol/L, 检出限为 10 nmol/L.

关键词 核酸适配体; 凝血酶; 磁珠; 比色分析

中图分类号 O657.32; O629.73 **文献标识码** A **文章编号** 0251-0790(2009)04-0701-05

适配体(Aptamer)是通过指数富集配基系统进化(SELEX)技术筛选出的一类能与蛋白质等靶物质特异性结合的寡聚核苷酸片段, 对目标分子具有高度亲和力和专一性的识别能力. 与抗体相比, 适配体可通过组合化学途径体外合成, 具有化学稳定性好、易于化学修饰和易储存等优点^[1]. 因此, 适配体作为一种生物识别传感元件, 在蛋白质高灵敏度检测及发展蛋白质传感阵列方面具有广泛的应用前景^[2]. 目前已开发了基于适配体的比色、荧光及电化学等方法, 用于各种疾病相关蛋白质的检测^[3-6]. 其中比色法具有操作简单、快速的优点, 引起了越来越广泛的关注.

凝血酶是凝血级联反应中重要的丝氨酸蛋白酶, 可将纤维蛋白原转换为不溶性的纤维蛋白, 形成正常生理状态下的纤维蛋白胶或病理状态下的血栓, 具有促凝和抗凝的功能^[7], 在一些心血管疾病中也发挥着重要作用^[8]. 目前已筛选出了与凝血酶特异性结合的两个单链脱氧核酸(ssDNA)适配体, 其中 G15D 适配体($K_d = 100$ nmol/L)与凝血酶纤维蛋白原识别位点结合^[9], 60-18[29]适配体($K_d = 0.5$ nmol/L)则结合于凝血酶的肝素结合位点^[10]. 利用这两个适配体与凝血酶的高亲和力及结合于不同位点的特性, 可构建夹心式结构对其进行检测. 例如, Xiang 等^[11]将生物素化的 G15D 固定在磁珠上, 利用 60-18[29]构建了夹心式结构, 通过 PCR 将 60-18[29]序列扩增, 并结合电化学方法对扩增产物中鸟嘌呤碱基进行测定, 实现了凝血酶 10^{-15} mol/L 级的检测; Centi 等^[12]则利用凝血酶的两个生物素化适配体构建了基于磁珠的夹心式结构, 加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的链霉亲和素与生物素化 60-18[29]结合, 通过电化学方法检测 HRP 的活性, 实现复杂基质(如血清和血浆蛋白)中凝血酶的检测, 最低检出限为 0.5 nmol/L.

本文利用磁珠作为快速有效的样品富集/净化途径, 结合简单直观的比色方式, 设计了一种简便、灵敏、特异性检测凝血酶的比色方法, 实现了对凝血酶靶蛋白的快速比色检测(图1), 并系统考察了适配体连接臂长对凝血酶检测的影响.

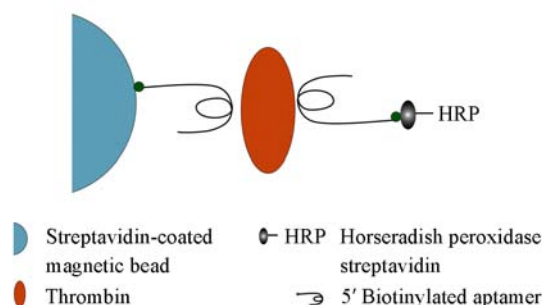


Fig. 1 Scheme of magnetic beads-based enzyme-linked aptamer sandwiched assay for the thrombin detection

收稿日期: 2008-06-17.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 20575078)资助.

联系人简介: 谢剑炜, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事毒物分析、分子识别与手性分离分析研究. E-mail: xiejw@bmi.ac.cn

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

HP8453 型紫外可见分光光度计(惠普公司, 美国), 12 道磁力架(Promega 公司, 美国).

适配体 THR- I, THR- II 均由上海生物工程公司(上海)合成, 序列见表 1; 链霉亲和素包被的磁珠(平均粒径 $1 \pm 0.5 \mu\text{m}$, 浓度 1 mg/mL) 购于 Promega 公司(美国); 凝血酶($M_w = 36700$, 3800 NIH units/mg) 购于 Haematologic Technologies 公司(美国); 牛血清白蛋白(BSA) 购于 Roche 公司(美国); 生物素及人血清白蛋白(HSA) 购于 Sigma-Aldrich 公司(美国); 牛血红蛋白购于 Worthington Biochemical 公司(美国); 溶菌酶购于 Amresco 公司(美国); 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB) 购于北京欣经科生物技术有限公司(北京); 辣根过氧化物酶标记链霉亲和素购于中杉金桥生物技术有限公司(北京); 人血清购自解放军 307 医院血站; 其它所有试剂均为国产分析纯. 实验用水为亚沸蒸馏水.

Table 1 Sequence of aptamers

Construct	Sequence	Description
THR- I	THR- I ₁ 5'-biotin-GGT TGG TGT GGT TGG-3'	G15D 5' labeled with biotin
	THR- I ₂ 5'-biotin-(spacer T) ₆ GGT TGG TGT GGT TGG-3'	G15D 5' labeled with biotin via 6 T linker
	THR- I ₃ 5'-biotin-(spacer T) ₁₀ GGT TGG TGT GGT TGG-3'	G15D 5' labeled with biotin via 10 T linker
	THR- I ₄ 5'-biotin-(spacer T) ₁₅ GGT TGG TGT GGT TGG-3'	G15D 5' labeled with biotin via 15 T linker
	THR- I ₅ 5'-biotin-(spacer T) ₂₀ GGT TGG TGT GGT TGG-3'	G15D 5' labeled with biotin via 20 T linker
THR- II	THR- II ₁ 5'-biotin-AGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT-3'	60-18[29] 5' labeled with biotin
	THR- II ₂ 5'-biotin-(spacer T) ₂₀ AGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACT-3'	60-18[29] 5' labeled with biotin via 20 T linker

1.2 溶液配制

Tris-HCl 缓冲液[50 mmol/L Tris, pH = 7.4, 含 140 mmol/L NaCl, 1 mmol/L MgCl₂, 0.5% (质量分数) BSA]; 底物缓冲液(51 mmol/L Na₂HPO₄, 24 mmol/L 柠檬酸, pH = 5.5); TMB 使用液: TMB(2 g/L 无水乙醇)0.5 mL, 底物缓冲液 10 mL, 0.75% H₂O₂ 32 μL ; 终止液: 2 mol/L 硫酸.

生物素溶液: 将适量生物素溶于水中, 配制成 2 mmol/L 的溶液, 在使用时用 Tris-HCl 缓冲液稀释至所需浓度; 适配体储备液: 将适配体溶于无菌双蒸水中, 制成 20 $\mu\text{mol/L}$ 的储备液; 人凝血酶储备液: 将凝血酶溶于含 20% 甘油的 PBS 缓冲液中, 制成 2 $\mu\text{mol/L}$ 的储备液, 分装并于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存, 使用时以 Tris-HCl 缓冲液稀释至所需浓度; HSA、溶菌酶及血红蛋白等分别溶于无菌双蒸水中制成储备液, 以上各储备液均分装并于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存, 使用时以 Tris-HCl 缓冲液稀释至所需浓度.

1.3 实验方法

1.3.1 磁珠上适配体的固定化 取 40 μL 链霉亲和素包被的磁珠悬浮液, 经 Tris-HCl 缓冲液充分洗涤后, 加入 0.6 $\mu\text{mol/L}$ THR-I 200 μL , 混匀后孵育 15 min, 于磁力架上沉淀磁珠并以 Tris-HCl 缓冲液洗涤, 重复沉淀/洗涤步骤以去除未结合的适配体, 测定结合前后的紫外吸光度值得磁珠对 THR-I 的结合率大于 90%; 继而加入 0.5 mmol/L 生物素 200 μL , 孵育 15 min 以封闭磁珠上未结合的链霉亲和素位点, 沉淀磁珠及使用 Tris-HCl 缓冲液去除多余的生物素, 将磁珠再次分散在 Tris-HCl 缓冲液中.

1.3.2 缓冲液和血清中凝血酶的捕获及检测 在上述均匀分散的溶液中, 加入 200 μL 不同浓度的凝血酶, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min, 磁性分离, 用 Tris-HCl 缓冲液洗涤; 加入 200 μL THR-II(0.2 $\mu\text{mol/L}$), 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min, 磁性分离, 用 Tris-HCl 缓冲液洗涤; 加入链霉亲和素标记的辣根过氧化物酶(1:900) 孵育 10 min, 磁性分离, 用 Tris-HCl 缓冲液洗涤; 加入 200 μL TMB 使用液显色 5 min, 加 100 μL 终止液终止反应, 稀释 3 倍后在 450 nm 处测定溶液的紫外吸光度值.

将人血清用 Tris-HCl 缓冲液稀释 20 倍, 加入一定量的凝血酶, 终体积为 200 μL ; 然后与连有 THR-I 的磁珠于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min, 磁性分离, 用 Tris-HCl 缓冲液洗涤; 其余操作同缓冲液中的步骤.

将人血清用 2 \times Tris-HCl 缓冲液稀释一倍, 加入一定量的凝血酶, 加入 THR- II 使其终浓度为 0.2 $\mu\text{mol/L}$, 终体积为 200 μL ; 然后与连有 THR- I 的磁珠于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min, 磁性分离, 用 Tris-HCl 缓冲液洗涤; 加入链霉亲和素标记的辣根过氧化物酶(1:900) 孵育 10 min, 磁性分离, 用 Tris-HCl 缓冲液

洗涤; 加入 200 μL TMB 使用液显色 5 min, 加 100 μL 终止液终止反应.

2 结果与讨论

2.1 适配体变性条件及 K^+ 浓度的考察

适配体经高温变性并缓慢降至室温或于冰浴上骤冷促使其结构有序化则更有利于与靶分子间的识别^[13]. Marathias 等^[14]则认为一些形成四聚体的 DNA 加热至 80 $^{\circ}\text{C}$ 后缓慢冷却可产生多种结构的混合物, 迅速冷却则会产生单一构象. 但在我们的实验中, 适配体无论事先是否变性(95 $^{\circ}\text{C}$, 5 min, 冰浴 10 min), 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育时均得到了与靶蛋白凝血酶相同的结合能力, 原因可能在于该条件下适配体变性前后或凝血酶加入时均具有相同构象^[15].

室温下, 凝血酶适配体 G15D 在溶液中以随机结构和四聚体结构的平衡形式存在^[16], 而 K^+ 存在可促使平衡向四聚体结构方向移动, 增强适配体与凝血酶的结合^[9]. 同时, 也有报道认为当温度接近适配体 G15D 的 T_m 值(46 $^{\circ}\text{C}$ ^[17])时, 四聚体热力学稳定性降低, 一定浓度 K^+ 的存在可稳定四聚体结构, 增强与凝血酶的结合^[15]. 实验考察了不同浓度的 KCl 对凝血酶结合能力的影响, 结果表明, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 的孵育条件下, 不加入 K^+ 时检测灵敏度更高(图 2). 这一结果说明在较低的温度时凝血酶适配体的四聚体结构具有热力学稳定性, 可不依赖于 K^+ 的存在, 凝血酶自身又可作为适配体的结构稳定元件, 稳定并促进四聚体的形成^[15,18].

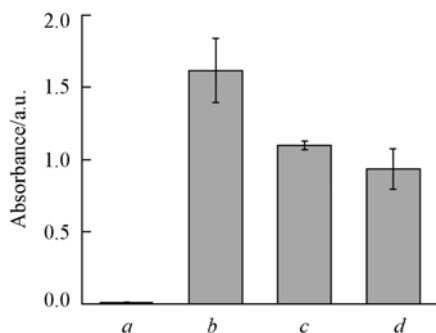


Fig. 2 Effect of K^+ on the detection of thrombin
 $c(\text{Thrombin}) = 40 \text{ nmol/L}$. a. negative control (no thrombin); b. 0 mmol/L KCl; c. 5 mmol/L KCl; d. 10 mmol/L KCl.

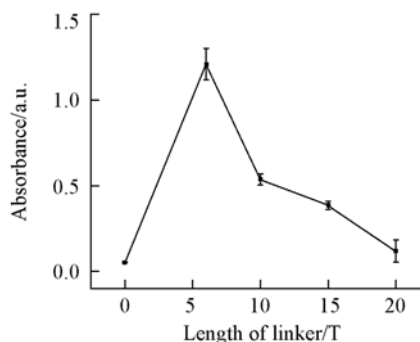


Fig. 3 Effects of the length of linker on the detection of thrombin
 $c(\text{THR-I}) = 0.6 \mu\text{mol/L}$; $c(\text{THR-II}_1) = 0.2 \mu\text{mol/L}$;
 $c(\text{thrombin}) = 40 \text{ nmol/L}$.

2.2 连接臂长的考察

核酸适配体一般具有较短的碱基序列, 即使以最为松散的无规结构存在时, 与抗体相比, 其尺寸亦大为减小. 因此在磁珠表面积固定的情况下, 使用一定长度的连接臂, 可使适配体适度离开磁珠表面, 在更大的空间范围捕获更多的靶分子. 另外, 一定长度连接臂的存在可促进适配体形成分子识别时所需的特定空间结构^[15]. 我们分别选择含有不同长度连接臂的适配体 THR-I (表 1) 捕获凝血酶, THR-II₁ 作为报告适配体, 比较其在相同条件下吸光度值的变化(图 3). 结果表明, 连接臂长度在 6 ~ 20 T 之间的适配体作为捕获探针时, 较之不含连接臂的适配体, 其吸光度均有所增加; 连接臂长度为 6 T 的适配体 THR-I₂ 作为捕获探针时, 可得到最高的检测灵敏度.

一般都将 G15D 适配体固定以实现凝血酶的检测, 尽管 60-18^[29] 适配体具有更低的解离常数, 但目前还没有固定 60-18^[29] 适配体检测凝血酶的详细报道. 本文尝试采用 60-18^[29] 适配体固定在磁珠上作为捕获适配体实现凝血酶的夹心法检测, 并研究了连接臂长对其检测的影响, 结果发现适配体连接臂长对其识别、检测凝血酶具有显著的影响, 结果如表 2 所示. 从表 2 可以看出, 当 THR-II 作为捕获适配体时, 通过设计适当长度的连接臂也可实现凝血酶的高灵敏检测, 且无凝血酶存在时具有较低的背景值. 其中不具有连接臂的 THR-II₁ 作为捕获适配体时吸光度值较大, 捕获凝血酶的能力最强; 具有 20 T 连接臂的 THR-II₂ 捕获凝血酶的能力相对较弱, 原因可能在于 THR-II₂ 过长的连接臂使适配体缠绕在磁珠表面, 减弱了与凝血酶的结合.

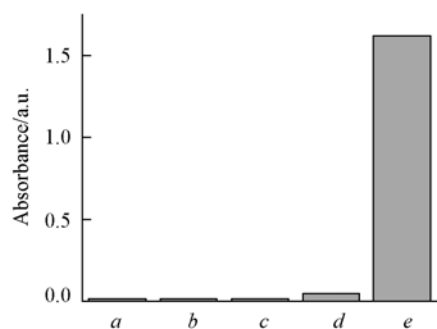
Table 2 Absorbance for thrombin detection using THR- II as capturing aptamer with different linker

Aptamer(capture)	Aptamer(detection)	Thrombin/(nmol · L ⁻¹)	Absorbance/a. u.
THR- II ₂	THR- I ₁	0	0.0324
THR- II ₂	THR- I ₁	40	0.0523
THR- II ₂	THR- I ₂	40	0.4271 (1/3 a. u.)
THR- II ₁	THR- I ₁	0	0.0587
THR- II ₁	THR- I ₁	40	0.2175
THR- II ₁	THR- I ₂	40	0.6342 (1/3 a. u.)

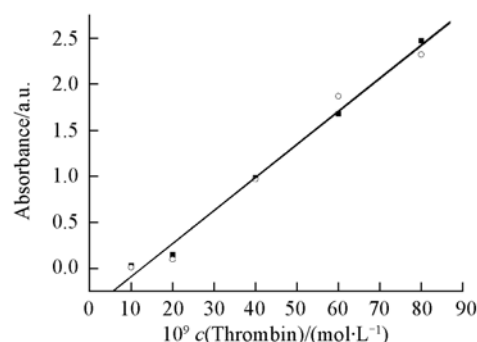
报告适配体连接臂长度对吸光度值也具有显著的影响,具有6 T连接臂的THR- I₂可能会促进其5'端生物素与链霉亲和素标记的HRP的结合,具有较高的检测信号值.与其相比,无连接臂的THR- I₁作为报告适配体时,信号值较低(表2).总之,夹心法检测中捕获适配体和报告适配体只有具备适当长度的连接臂时,才能形成特定的空间结构与靶蛋白结合,实现其检测.

2.3 检测方法的特异性

以高浓度的人血清白蛋白、牛血红蛋白及溶菌酶为考察对象,模拟实际天然基质中可能存在的高丰度蛋白,考察了本方法的特异性.以含0.5% BSA(70 μmol/L)的Tris-HCl缓冲液中无凝血酶时作为阴性对照,此时吸光度值几乎为零;当此缓冲液中加入40 μmol/L的人血清白蛋白、牛血红蛋白或溶菌酶时,吸光度值均小于0.1;凝血酶存在时,才会产生较高的吸光度值(图4).表明该方法对凝血酶具有很高的特异性,溶液中非特异性蛋白存在不会干扰凝血酶的测定.

**Fig. 4** Effect of interfering proteins on the specificity of the biosensor

a. Negative control; b. 40 μmol/L HSA; c. 40 μmol/L bovine hemoglobin; d. 40 μmol/L lysozyme; e. 40 nmol/L thrombin.

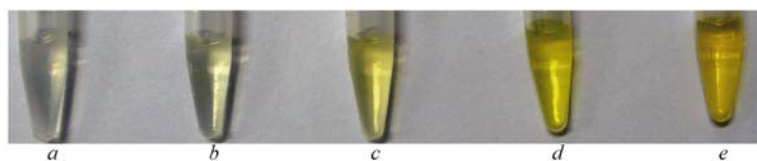
**Fig. 5** Calibration curve of thrombin detection

■ In buffer; ○ in 5% serum.

2.4 凝血酶的定量测定

以Tris-HCl为缓冲液;THR- I₂作为捕获适配体;孵育温度为4 °C条件下对凝血酶进行定量检测,结果如图5所示,凝血酶浓度在10~80 nmol/L之间时,其吸光度值与凝血酶浓度成线性相关,线性回归方程为 $Y = 0.03591X - 0.44548$,线性相关系数为0.9962,检出限为10 nmol/L.

该方法亦适用于复杂基质血清中凝血酶的检测,血清的组成与血浆相似,但是其中不含有凝血蛋白和凝血因子,将血清稀释20倍,凝血酶浓度在10~80 nmol/L之间时,吸光度值与凝血酶浓度成线性相关(图5),其线性回归方程为 $Y = 0.03577X - 0.44858$,线性相关系数为0.9910,检出限为10 nmol/L,由此可知,5%血清对此检测方法几乎不产生干扰;利用此方法也可实现50%血清中凝血酶的比色检测,如图6所示.

**Fig. 6** Colorimetric detection of different concentration of thrombin in 50% serum

Concentration of thrombin(nmol · L⁻¹): a. 0; b. 10; c. 20; d. 50; e. 100.

该法检测范围较窄,这是由于高浓度的凝血酶产生的吸光度值超出了仪器的检测范围;然而,通过肉眼观测我们发现高浓度凝血酶与吸光度值仍呈正相关. 实验测定的相对标准偏差在 0.2%~22% 之间,与常规的酶联免疫法相当.

参 考 文 献

- [1] Osborne S. E. , Ellington A. D. . Chem. Rev. [J], 1997, **97**: 349—370
- [2] Numnuam A. , Chumbimuni-Torres K. Y. , Xiang Y. , *et al.* . Anal. Chem. [J], 2008, **80**: 707—712
- [3] LI Yi-Lin(李一林), GUO Lei(郭磊), ZHANG Zhao-Yang(张朝阳), *et al.* . Science in China, Series B(中国科学, B 辑)[J], 2008, **38**: 1—11
- [4] ZHENG Jing(郑静), FENG Wan-Juan(冯婉娟), CHENG Gui-Fang(程圭芳), *et al.* . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2007, **28**(12): 2274—2279
- [5] TU Yong-Hua(徒永华), CHENG Gui-Fang(程圭芳), LIN Li(林莉), *et al.* . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2006, **27**(12): 2266—2270
- [6] GUO Qiu-Ping(郭秋平), YANG Xiao-Hai(羊小海), WANG Ke-Min(王柯敏), *et al.* . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2008, **29**(1): 37—40
- [7] Holland C. A. , Henry A. T. , Whinna H. C. , *et al.* . FEBS Lett. [J], 2000, **484**: 87—91
- [8] Stubbs M. T. , Bode W. . Thromb. Res. [J], 1993, **69**: 1—58
- [9] Bock L. C. , Griffin L. C. , Latham J. A. , *et al.* . Nature[J], 1992, **355**: 564—566
- [10] Tasset D. M. , Kubik M. F. , Steiner W. . J. Mol. Biol. [J], 1997, **272**: 688—698
- [11] Xiang Y. , Xie M. , Bash R. , *et al.* . Angew. Chem. Int. Ed. [J], 2007, **46**: 9054—9056
- [12] Centi S. , Tombelli S. , Minunni M. , *et al.* . Anal. Chem. [J], 2007, **79**: 1466—1473
- [13] Liu X. , Zhang, D. , Cao G. , *et al.* . J. Mol. Recognit. [J], 2003, **16**: 23—27
- [14] Marathias V. M. , Bolton P. H. . Biochemistry[J], 1999, **38**: 4355—4364
- [15] Baldrich E. , Restrepo A. , O'Sullivan C. K. . Anal. Chem. [J], 2004, **76**: 7053—7063
- [16] Li J. J. , Fang X. , Tan W. . Biochem. Biophys. Res. Commun. [J], 2002, **292**: 31—40
- [17] Tang C. F. , Shafer R. H. . J. Am. Chem. Soc. [J], 2006, **128**: 5966—5973
- [18] Baldrich E. , O'Sullivan C. K. . Anal. Biochem. [J], 2005, **341**: 194—197

New Magnetic Beads-based Enzyme Linked Aptamer Colorimetric Assay for Trace Amount Protein Detection

SHEN Rui, TANG Ji-Jun, ZHANG Zhao-Yang, GUO Lei, XIE Jian-Wei *

(Beijing Institute of Pharmacology and Toxicology, Beijing 100850, China)

Abstract Choosing nucleic acid aptamers as a high efficient and special recognition/sensing element, we developed a novel colorimetric assay based on magnetically separation and special capture to achieve the goal of capturing/tracing target protein. Two different aptamers simply biotinylated, which bound the thrombin in different sites with high affinity, were chosen to develop a sandwich assay. The protein was captured by aptamer-functionalized magnetic beads and detected after the addition of the second biotinylated aptamer and of streptavidin labeled with an enzyme, and the detection of the product generated by enzymatic reaction was achieved by colorimetric assay. This magnetic beads based enzyme linked aptamer assay was capable of capturing thrombin with high specificity, didn't be affected by other interfering proteins in complex matrix such as human serum albumin and bovine hemoglobin. The detection of thrombin in serum could be carried out with naked eyes, without the need of expensive analytical instruments and more assay time. A linear range from 10 to 80 nmol/L is obtained with a detection limit of 10 nmol/L for thrombin.

Keywords Aptamer; Thrombin; Magnetic bead; Colorimetric

(Ed. : Y, G)