超顺磁纳米颗粒弛豫时间传感技术 在生化分析中的研究进展

陈翊平¹²,邹明强^{1*},王大宁²,谢孟峡²,王燕飞¹,薛 强¹,李锦丰¹

(1. 中国检验检疫科学研究院,北京 100123;2. 北京师范大学 分析测试中心,北京 100875)

摘 要: 该文介绍了基于超顺磁纳米颗粒的弛豫时间(T₂)传感技术及其在生化分析应用中的研究进展。在均 匀磁场中,超顺磁纳米颗粒状态的变化(分散或聚集)会改变磁场的均匀度进而引起周围水分子质子弛豫时间 的改变,即磁弛豫时间传感效应。磁颗粒经表面修饰后与给体/受体偶联形成磁传感探针,当与待测物发生 特异性反应后,引起介质磁颗粒聚集状态改变,使相应弛豫时间改变,变化程度与待测分子含量呈相关关 系,从而实现待测物的传感分析。该传感技术结合纳米技术、核磁共振技术和生物免疫学技术,不依赖光信 号,耗样量少,具有前处理简单、快速、灵敏、无损、适于现场检测等优点,在临床诊断、环境分析、食品 安全、公共卫生安全和生物大分子相互作用研究等领域有广阔的应用潜力。

关键词:超顺磁纳米颗粒;弛豫时间;纳米传感;生化分析

中图分类号: 0472.5; G353.11 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2011)11-1224-06 doi: 10.3969/j.issn.1004-4957.2011.11.004

Research Progress on Magnetic Relaxation Switches Based on Superparamagnetic Nanoparticle and Their Applications in Biochemical Analysis

CHEN Yi-ping^{1,2}, ZOU Ming-qiang^{1*}, WANG Da-ning², XIE Meng-xia²,

WANG Yan-fei1 , XUE Qiang1 , LI Jin-feng1

 Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100123, China; 2. Analytical & Testing Center of Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

Abstract: The magnetic relaxation switches (MRS) technology based on superparamagnetic nanoparticles (SMP) and their applications in biochemical analysis were introduced in this paper. In homogenous magnetic field of miniaturized nuclear magnetic , the dispersed and aggregated states of SMP produce local inhomogeneities in the applied magnetic field , resulting in the decrease or increase in the spin \pm spin relaxation time (T_2) of surrounding water molecules , which is called magnetic relaxation time (MRS) sensing effect. The magnetic particles binding with specific molecules can act as magnetic relaxation switches (MRS) when they coupled specially with target analytes. In MRS assays , the presence of an analyte causes the particles to transition between dispersed and clustered states and affects the T_2 relaxation times of surrounding water molecules. Compared with the conventional immunological methods , MRS assay is more sensitive , simple and time-saving due to its combination of nanobiotechnology , nuclear magnetic resonance and immunoassay. Predictably , it has a remarkable application potential in the fields of medical diagnosis , environmental monitoring , food safety analysis , public healthy security and molecular interactions study , etc.

Key words: superparamagnetic particle(SMP); magnetic relaxation switches(MRS); nano biological sensing; biochemical analysis

超顺磁纳米颗粒(Superparamagnetic particles, SMP) 是 20 世纪 80 年代出现的一种新型纳米磁性材料,因其比表面积大以及在外界磁场下可定向运动,在免疫分离分析、核酸分离与杂交、靶向给药、 核磁共振成像等领域得到了广泛应用^[1-12]。Perez 等^[13]发现当 SMP 在水溶液中的状态(分散或聚集)变

收稿日期: 2011-10-08; 修回日期: 2011-10-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20875084); 中国检验检疫科学研究院基本科研业务费资助项目(2010JK016)

^{*} 通讯作者: 邹明强,博士,研究员,研究方向: 分析科学新技术、新方法、新装备的研究与开发,Tel: 010 – 85747380, E – mail: mingqiangz@ sina. com

化时会引起磁场均匀性发生改变,进而显著引起周围水分子质子的横向弛豫时间(*T*₂)发生改变。SMP 经表面修饰,偶联上相关抗体/抗原或给体/受体后即可制备成具有特异性的磁弛豫时间传感探针(Magnetic relaxation switches, MRS),通过特异性亲和反应,使体系中分散状态的磁颗粒转变为聚集状态^[14-15],或使聚集状态转变为分散状态^[6],由于状态改变的程度与目标分子含量相关,通过弛豫时间 的改变可间接得到目标分子的含量。目前,基于 SMP 的 MRS 传感技术具有处理简单、快速、灵敏、无 损、可现场检测等优点,在生物分子间相互作用研究、大分子/小分子目标物分析等方面得到了 应用^[17-19]。

1 MRS 传感机制研究

自 Perez 等^[13]率先开展基于 SMP 的 MRS 技术以来,相关研究引起了研究者极大的兴趣,并在传感 机理、机制等方面进行了探讨。

基于 SMP 的 MRS,其灵敏度和可靠性主要取决于 SMP 的大小、磁饱和度及各组分浓度等因素。 Taktak 等^[19]以生物素化的 SMP 作为探针,用亲和素标记的待测分子为研究对象,通过生物素 – 亲和素 的特异性结合引起 SMP 状态改变,系统研究了横向弛豫时间率(Spin – spin relation rate, $1/T_2$)、纵向 弛豫时间率(The spin – lattice relaxation rate, $1/T_1$)、 T_1/T_2 以及 T_2 重复性测量等参数,进一步发展了 多参数磁信号检测方法的理论。Koh 等^[20]分别基于超顺磁纳米磁颗粒和超顺磁微米磁颗粒,以流感血 凝素对应的靶标多肽及其相应的抗体为对象研究了 MRS 体系。研究结果表明,以超顺磁微米磁颗粒作 为弛豫时间传感探针时,其状态由分散到聚集可引起周围水分子氢原子弛豫时间(T_2)的增大。相反, 以超顺磁纳米磁颗粒,状态由分散到聚集则引起周围水分子氢原子弛豫时间(T_2)的减少。用较大尺度 磁颗粒制备弛豫时间传感探针更有利于降低方法的检出限,提高灵敏度;该研究还发现周围水分子弛 豫时间的改变与被分析物浓度和结合位点密切相关,当磁颗粒探针和被分析物间的结合达到平衡时, 引起的 T_2 变化最大;该研究进一步阐明了超顺磁颗粒弛豫时间传感技术原理,为后续应用研究奠定了 基础。

2 MRS 在生化分析中的应用

2.1 在生物分子间相互作用研究中的应用

作为一种表征手段,基于目标分子和超顺磁纳米颗粒间结合而导致周围水分子弛豫时间 T₂ 改变的 原理,可将 MRS 技术用于生物体系目标分子的相互作用研究。

Perez 课题组首先将生物兼容性好的 SMP 作为 MRS 传感材料用于生物分子相互作用的研究^[21]。目前 MRS 传感技术已成功用于生物分子蛋白质 – 蛋白质、DNA – DNA、蛋白质 – 小分子生物/大分子之间的相互作用研究^[22]。用该传感技术研究生物分子之间相互作用具有如下优点:①可直接在生物组织中研究蛋白与小分子、蛋白与蛋白之间的相互作用;②不需要光源,因此无需考虑样品是否透明,无需对样品进行纯化;③灵敏度高,当 DNA 中的一个碱基发生错配时,即可通过弛豫时间(*T*₂)的改变来定量表征。研究结果表明,以 MRS 传感技术研究目标大分子的相互作用是一种高效、超灵敏、高通量的表征技术平台。该研究小组用原子力显微镜和透射电镜表征 SMP 反应前后形态的变化(如图 1)。结果显示,随着反应的进行,SMP 粒径由原来的 8 nm 增大到 200~300 nm,证实反应前后 SMP 状态已发生了变化。

2.2 在临床诊断中的应用

临床医学中通常需要快速、准确地检测特征性标志物以进行疾病诊断。因 SMP 具有高灵敏度的磁 感应性和稳定性,作为一种有潜力的磁性纳米传感材料在临床诊断中发挥着重要作用。Colombo 等^[23] 以抗人血清白蛋白(HSA)的抗体为特征蛋白,将修饰后的超顺磁性纳米粒子作为弛豫时间传感探针, 建立了快速、准确检测人体内 HSA 抗体含量的方法。该方法的灵敏度可达到 fmol 级,既可定量,也可 定性,结果准确可靠,结合核磁共振成像(MRI)还可实现高通量检测。Kim 等^[24]基于磁颗粒弛豫时间 传感原理快速检测了人绒毛促性激素亚单元(hCG)和蛋白 A,讨论了磁颗粒、抗体和反应物间比例对 SMP 聚集程度和快慢的影响。结果表明,一定范围内的待测物浓度与弛豫时间改变呈线性关系;且溶 液中 SMP 的大小及聚集程度对检测灵敏度和稳定性的影响较大,如果 SMP 聚集程度太大将引起沉淀, 直接影响实验结果的可靠性。Weissleder 等^[25]用纳米磁传感检测方法快速检测了肿瘤细胞和正常细胞 中一种重要致癌酶(Telomerase)的含量,该方法比传统的逆转录 PCR(Reverse transcription – PCR) 和蛋 白印迹(Western blots)等方法成本低且快速、普适性强,这对于癌症诊断具有重要意义。



图 1 超顺磁纳米传感器反应前后的 TEM 及 AFM 成像^[21] Fig. 1 Transmition electron microscopy(TEM) and atomic force microscopy (AFM) images of a monolayer of nanosensors^[21]

最近,Kong 研究组开发了一种结合 MRS 传感技术和色度法检测人凝血酶的方法^[26],该法通过还 原 HAuCl₄ 将 Au 和表面被葡聚糖包裹的 Fe₃O₄纳米粒子偶联,制备成同时具有磁效应和光效应的 Fe₃O₄ @ Au 二元纳米传感探针。通过特异性免疫反应,使 Fe₃O₄@ Au 纳米粒子发生聚集,导致弛豫时间(T_2) 和吸光光谱同时发生改变,弛豫时间改变用于定量分析,光谱改变用于定性研究,同时获得的定量定 性信息使检测结果更可靠,线性范围增大,通过该方法测得人凝血酶的检出限为 1.0 nmol/L,线性范 围为 1.6~30.4 nmol/L。

2.3 在耐药病原体检测中的应用

近 20 年,由于抗生素的广泛使用甚至滥用,增强了许多病原体(如细菌)的耐药性,很大程度上影响了治疗效果。因此亟需开发一种灵敏和低成本的致病菌检测方法,该方法应解决以下 3 个问题:① 快速确定对抗生素产生耐受性的致病菌;②寻找微生物敏感的药理学因子(Pharmacological agents);③ 在此基础上找到合适的用药剂量,为成功治疗和防止流行病提供依据。采用传统方法,如进行微生物 培养后再检测,需耗时 48 h。Perez 研究组开发了一种快速分析细菌代谢活性及其抗药敏感性的 MRS 纳米传感方法^[27],基于检测细菌在代谢中消耗营养物(多糖)的量来间接分析细菌代谢活性及其针对特 定抗生素的耐受性,可以区分有活性代谢物和死亡的病原体,弥补了传统检测方法的不足。该方法的 检出限为 102 CFUs,整个检测过程只需 2.5 h,所需样品量为 10 μL;而传统的最小抑制浓度法(MIC) 需耗时 24 h,用样量为 2 mL。由此可见,MRS 传感方法大大加快了检测速度,同时避免了繁琐费力的 显微镜目测步骤,为解决上述问题提供了新的思路,在抗生素药物研发方面有较大的应用前景。

2.4 在细菌、病毒及某些特征蛋白等大分子分析中的应用

将抗病毒的抗体偶联在 SMP 上即可制成磁信号探针,基于抗体与病毒之间的特异性作用,形成以 病毒为中心的团聚体,使原本分散的纳米磁颗粒转变成团聚态,使仪器中的磁场均匀性改变,从而影 响周围水分子质子的弛豫时间,通过弛豫时间的变化量计算体系中的病毒含量(见图 2)^[28]。这种检测 模型也适用于细菌及某些特征蛋白等大分子的分析。

Perez 研究组首先将 SMP 作为 MRS 传感探针分别用于生物样品中病毒和细菌的检测^[28-29]。基于 MRS 传感技术建立了血清中疱疹病毒(HSV)和腺病毒(ADV)的检测方法,该方法的灵敏度很高,检出 限可达到 5 个病毒/10 μL 血清(含 25% 的蛋白),因此病毒不需要传统的 PCR 技术进行扩增,节省了 时间。基于同样的原理,该课题组建立了快速、灵敏地检测血清和牛奶中 Mycobacterium avium spp. (MAP)细菌的方法,检出限可达 15.5 CFUs,远低于其他传统方法。由于该方法具有灵敏度高等优点, 可减少对生物样品进行增菌培养或 PCR 扩增等环节,节省了数十小时的检测时间。这种全新的检测手 段,不依赖光信号,所需的样品量很少,特别适合于复杂生物样品中病毒和细菌的检测。另外,经过 仪器功能和小型化改进后,该传感技术易实现高通量、现场快速检测。最近该课题组又研究了 SMP 探 针自身结合效价对方法灵敏度、线性范围的影响^[30]。将表面包裹不同数目叶酸的 Fe₂O₃ 超顺磁纳米颗 粒作为表面结合效价不同的两种纳米传感探针。结果表明,表面结合位点多的 Fe₂O₃ 纳米传感探针更 有利于提高检测灵敏度,可检测到血液样本中的单个癌细胞,且检测时间只需 15 min。Josephson 等^[31] 以流感病毒为研究对象,采用 3 种方法提高了 MRS 传感的检测灵敏度,见图 3。





Fig. 2 Scheme for the detection of virus based on the MRS^[28]



图 3 提高 MRS 检测灵敏度的 3 种技术途径^[15] Fig. 3 Three approaches of increasing MRS sensitivity^[15]

图 3a 通过使用微米级超顺磁颗粒代替纳米级超顺磁颗粒以减少磁颗粒的浓度;图 3b 系通过外加 磁场提高灵敏度:在外加磁场作用下超顺磁 MP 发生聚集,但当去掉外加磁场时,含有待测物组的 MPs 可与其形成稳定的聚集网络体,从而保持原有状态,在均匀磁场中产生较高的 T₂;而不含待测物 组的 MPs,在外加磁场去除时会自动散开,从而可产生较大的 T₂ 差;图 3c 通过增加反应体系结合位 点的方式来增加聚集程度,从而提高检测灵敏度。 基于纳米磁性颗粒的 MRS 传感技术也已成功用于蛋白分析。Kong 研究组^[32] 建立了酸性糖蛋白 (A1 – acid glycoprotein(AGP))的 MRS 检测方法,该研究克服了超顺磁探针和分析物的比例不合适而引 起的前区效应(Prozone effect),从而保证了 MRS 方法的准确性。该方法简便、高效,对目标物 AGP 的 检测限可达 0.66 nmol/L,该数值低于人体 AGP 正常水平。Cai 等^[33]以聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)为材 质研制了小型、高通量(18 通道)的芯片成像单元,基于核磁共振成像和弛豫时间(T_2)传感测量成功用 于前列腺标志蛋白(PSA)的定性和定量检测,线性范围为 17.3~43.2 ng/mL,检出限为 13.7 ng/mL, 18 个样本同步分析仅需 26 min(如图 4 所示)。



图 4 弛豫时间传感芯片多通道检测蛋白的示意图^[33] Fig. 4 Illustration of magnetic relaxation switches and on-chip multi-sample protein detection^[33]

2.5 在有害小分子检测中的应用

基于竞争性免疫反应而改变纳米磁颗粒分散状态的原理,可以实现小分子物质的磁共振弛豫时间 传感检测。Wang 研究组^[34]基于均相免疫学原理,先将微囊藻毒素全抗原与 SMP 偶联制备成弛豫时间 传感探针,而后基于抗原 – 抗体及一抗 – 二抗的特异反应,建立了小分子竞争免疫检测方法。通过二 抗与多个一抗连接的 "桥接"作用,使原溶液中分散状的磁颗粒变为聚集状态,从而改变磁颗粒周围 水分子的弛豫时间(*T*₂),达到检测样品中微囊藻毒素的目的,其检测原理如图 5 所示。该方法的检出 限为 0.6 ng • g⁻¹,线性范围为 1~18 ng • g⁻¹。Kulkarni等^[35]以糖类为识别单元,基于弛豫时间传感技术 建立了简单、快速、灵敏的外源凝集素类和毒素的检测方法,提供了复杂基质样本中毒素的检测新方法。



图 5 利用弛豫时间传感技术检测小分子的原理图^[35] Fig. 5 Scheme for detection of molecule based on the magnetic relaxation switches^[35] 第11期

3 展 望

综上所述,基于超顺磁颗粒的弛豫时间传感技术是集纳米/微米技术、免疫技术及核磁共振技术于 一体的多学科交叉、多技术集成的前沿分析技术,其主要优势在于:①该技术不依赖光信号,通过改 变磁颗粒状态而改变其周围水分子质子弛豫时间进而达到信号的转化,大大避免了复杂基质的干扰, 因此成分复杂、浑浊的生物/环境等样品可以直接测量,减少了样品前处理等复杂步骤;②该技术涉及 的免疫反应是一种均相反应体系,无需固液分离,减少了传统酶联免疫分析中的洗板和显色等步骤, 同时由于磁颗粒悬浮于整个体系中,因此可使抗体与抗原充分接触、反应,缩短反应时间,尤其适于 食品和环境样本中痕量有害物质的快速、灵敏检测;③该技术无需获得核磁波谱信号,而是基于核磁 弛豫时间的改变进行传感测试,具有简便、高效等优点。目前,该技术在医疗诊断、食品安全、环境 分析等领域的应用才刚刚开始,随着相关理论研究的不断深入及与其他新技术(如芯片技术)的进一步 结合,该传感技术将朝着高通量和现场分析方向发展,其应用领域将进一步拓宽和深入。

参考文献:

- [1] Thanha N T K , Green L A W. Nano Today , 2010 , 5: 213 230.
- [2] Zhuang J, Cheng T, Gao L Z, Luo Y T, Ren Q, Lu D, Tang F Q, Ren X L, Yang D L, Feng J, Zhu J D, Yan X Y. Toxicon, 2010, 55: 145 152.
- [3] Dhumpa R , Bu M Q , Handberg K J , Wolff A , Bang D D. J. Virol Methods , 2010 , 169: 228 231.
- [4] Laurent S, Forge D, Port M, Roch A, Robic C, Elst L V, Muller R N. Chem. Rev., 2008, 108: 2064 2110.
- [5] Lu A H , Salabas E L , Schuth F. Angew. Chem. Int. Ed. , 2007 , 46: 1222 1244.
- [6] Parka I K , Ng C P , Wang J N , Chu B C , Yuan C , Zhang S R , Pun S H. Biomaterials , 2008 , 29: 724 732.
- [7] Jun Y W , Lee J H , Cheon J W. Angew. Chem. Int. Ed. , 2008 , 47: 5122 5135.
- [8] Na H B , Song I C , Hyeon T. Adv. Mater , 2009 , 21: 2133 2148.
- [9] Qiao R R , Yang C H , Gao M Y. J. Mater. Chem. , 2009 , 19: 6274 6293.
- [10] Schlorf T, Meincke M, Kossel E, Glüer C C, Jansen O, Mentlein R. Int. J. Mol. Sci., 2011, 12: 12-23.
- [11] Xie J, Xu C J, Kohler N H, Hou Y L, Sun S H. Adv. Mater., 2007, 19: 3163-3166.
- [12] Koh I, Josephson L. Sensors, 2009, 9: 8130-8145.
- [13] Perez J M , Josephson L , Oloughlin T , Hogemann D , Weissleder R. Nat. Biotechnol. , 2002 , 20: 816-820.
- [14] Tsourkas A, Hofstetter O, Hofstetter H, Weissleder R, Josephson L. Angew. Chem. Int. Ed., 2004, 43: 2395 2399.
- [15] Daniel K D , Kimb G Y , Vassilioue C C , Galindoa M , Guimaraesd A R , Weisslederd R , Charest A , Langera R , Cima M J. Biosens. Bioelectron. , 2009 , 24: 3252 – 3257.
- [16] Qiao R R , Yang C H , Gao M Y. J. Mater. Chem. , 2009 , 19: 6274 6293.
- [17] Schlorf H, Meincke M, Kossel E, Glüer C C, Jansen O, Mentlein R. Int. J. Mol. Sci., 2011, 12: 12-23.
- [18] Guo L , Liu G , Hong R Y , Li H Z. Mar. Drugs , 2010 , 8: 2212 2222.
- [19] Taktak S , Sosnovik D , Cima M J , Weissleder R , Josephson L . Anal. Chem. , 2007 , 79: 8863 8869.
- [20] Koh I , Hong R , Weissleder R , Josephson L. Anal. Chem. , 2009 , 81: 3618 3622.
- [21] Perez J M , Josephson L , Weissleder R. ChemBioChem. , 2004 , 5: 261 264.
- [22] Oloughin J T , Simeone F J , Weissleder R , Josephson L. J. Am. Chem. Soc. , 2002 , 124(12): 2856-2857.
- [23] Colombo M, Ronchi S, Monti D, Corsi F, Trabucchi E, Prosperi D. Anal. Biochem. , 2009, 392: 96 102.
- [24] Kim G Y, Josephson L, Langer R, Cima M J. Bioconjugate Chem. , 2007, 18: 2024 2028.
- [25] Perez J M , Grimm J , Josephson L , Weissleder R. Neoplasia , 2008 , 10(10): 1066 1072.
- [26] Liang G H , Cai S Y , Zhang P , Peng Y Y , Chen H , Zhang S , Kong J L. Anal. Chim. Acta , 2011 , 689: 243 249.
- [27] Kaittanis C , Nath S , Perez J M. PLoS ONE , 2008 , 3(9): e3253.
- [28] Perez J M , Simeone F J , Saeki Y , Josephson L , Weissleder R. J. Am. Chem. Soc. , 2003 , 125: 10192 10193.
- [29] Kaittanis C , Naser S A , Perez J M. Nano Lett. , 2007 , 7(3): 380 383.
- [30] Kaittanis C , Santra S , Perez J M. J. Am. Chem. Soc. , 2009 , 131: 12780 12791.
- [31] Koh I, Hong R, Weissleder R, Josephson L. Angew. Chem. Int. Ed., 2008, 47: 4119-4121.
- [32] Cai S Y , Liang G H , Zhang P , Chen H , Zhang S , Liu B H , Kong J L. Analyst , 2011 , 136: 201 204.
- [33] Cai S Y , Liang G H , Zhang P , Chen H , Zhang S , Liu B H , Kong J L. Biosens. Bioelectron. , 2011 , 26(5): 2258 2263.
- [34] Ma W, Chen W, Qiao R R, Liu C Y, Yang C H, Li Z K, Xu D H, Peng C F, Jin Z Y, Xu C L, Zhu S F, Wang L B. Biosens. Bioelectron. , 2009, 25: 240 243.
- [35] Kulkarni A A , Weiss A A , Iyer S S. Anal. Chem. , 2010 , 82: 7430 7435.