

基于核酸适体的新型液晶生物传感用于 检测血小板源性生长因子 BB

李霞 谭慧 李云磊 吴朝阳* 沈国励 俞汝勤

(湖南大学化学生物传感与计量学国家重点实验室, 化学化工学院, 长沙 410082)

摘 要 利用核酸适体与其靶分子具有高度特异性结合的原理,建立了基于液晶取向改变的以核酸适体为捕获探针用于检测血小板源性生长因子 BB(Platelet-derived growth factor BB, PDGF-BB) 分子的新型液晶生物传感方法。核酸适体通过戊二醛偶联固定在 3-氨丙基三乙氧基硅烷/*N,N*-二甲基-*N*-十八烷基 [3-(三甲氧基硅基)丙基]氯化铵 [(3-Aminopropyl) trimethoxysilane/*N,N*-dimethyl-*N*-octadecyl(3-aminopropyl) trimethoxysilyl chloride, APTES/DMOAP]混合自组装的传感基底表面,当靶分子 PDGF-BB 存在时,可与核酸适体发生特异性作用结合于传感基底表面。根据生物分子的空间尺寸效应能诱导液晶分子取向发生变化,从而引起光学信号的亮度和色彩发生改变,实现对 PDGF-BB 的快速检测。本方法具有操作简单、选择性好、灵敏度高的特点,在 PDGF-BB 浓度为 5 nmol/L 时仍可观察到明显的光学信号变化。

关键词 核酸适体; 血小板源性生长因子 BB; 液晶生物传感; 自组装膜

1 引 言

液晶生物传感是基于液晶分子在功能膜表面排列取向发生变化,改变液晶分子对光线的折射能力,将界面上产生的反应变化信息转换成光学信号变化,实现对目标物的检测^[1,2]。与传统的分析检测方法相比,液晶生物传感无需采用外源性标记物修饰,在自然光下就能进行检测,所呈现的光学信号可用肉眼观察,具有操作简单、响应快速、易于实现微型化和阵列化等特点,使其在生命科学、临床医学和环境研究上具有广泛的应用前景。蛋白质作为机体细胞的重要组成部分,是人体组织更新和修补的主要原料。它对调节生理功能,维持新陈代谢都起着重要作用。因此,蛋白质检测是目前临床诊断以及化学与生物研究上的一个重要课题^[3~5]。

本研究基于大分子物质,特别是蛋白质分子的空间尺寸效应能有效干扰液晶分子有序排列的原理^[6,7],以核酸适体为捕获探针建立了基于液晶取向改变的新型液晶生物传感方法用于检测血小板源性生长因子 BB(Platelet-derived growth factor BB, PDGF-BB)。PDGF-BB 作为人体血小板中含有的一种促进细胞有丝分裂、趋化活性的生长因子^[8~11],在正常细胞中含量较少,但在一些人类肿瘤细胞中却常常发生基因过表达,是癌症诊断中的一种标志物^[12],因此发展对其灵敏的检测方法引起了人们很大的兴趣。本研究结合液晶生物传感的优点,建立了一种无需标记、操作简单、选择性好、成本低、响应快速的液晶生物传感检测 PDGF-BB 的方法。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Nikon Eclipse 50i POL 偏光显微镜(尼康公司); MD50 显微镜照相机装置(广州市明美光电技术有限公司); F7000 荧光分光光度计(日立公司)。

实验所用核酸适体由上海生工有限公司合成。重组人血小板源性生长因子 BB(Platelet-derived growth factor BB, PDGF-BB)、牛血红蛋白(Bovine hemoglobin, BHb)、牛血清蛋白(Bovine serum albumin, BSA)、凝血酶(Thrombin)、*N,N*-二甲基-*N*-十八烷基 [3-(三甲氧基硅基)丙基]氯化铵(*N,N*-dime-

2013-11-12 收稿; 2014-01-11 接受

本文系国家自然科学基金项目(Nos. 21175037, 21277042, J1210040) 和湖南省科研条件创新专项重点项目(No. 2011TT1004) 资助

* E-mail: zywu@hnu.edu.cn

thyl-*N*-octadecyl(3-aminopropyl) trimethoxysilyl chloride, DMOAP)、3-氨基丙基三乙氧基硅烷 [(3-Aminopropyl) trimethoxysilane, APTES)、氰基硼氢化钠 (NaBH_3CN) 以及戊二醛, 均购自美国 Sigma-Aldrich 公司; SYBR Green I (SG) 核酸染料 (北京鼎国试剂公司); 4-腈基-4'-戊基联苯液晶 (4-cyano-4'-pentylbiphenyl, 5CB, 石家庄斯迪亚诺精细化工有限公司); 载玻片 (扬州三月玻璃制品有限公司); Mylar 聚酯薄膜 (厚度 $20\ \mu\text{m}$, 广州舒歌电子有限公司); 实验室所用水为超纯水 (电阻不小于 $18.3\ \text{M}\Omega$)。

核酸适体: $5' \text{-NH}_2 \text{-(CH}_2\text{)}_6 \text{-CAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTG-3'}$ 。核酸适体缓冲液: $20\ \text{mmol/L Na}_2\text{HPO}_4$ 和 NaH_2PO_4 (pH 7.2), $140\ \text{mmol/L NaCl}$, $5\ \text{mmol/L KCl}$, $1\ \text{mmol/L MgCl}_2$, $10\ \text{mmol/L NaBH}_3\text{CN}$ 。蛋白缓冲液: $20\ \text{mmol/L Na}_2\text{HPO}_4$ 和 NaH_2PO_4 (pH 7.2), $140\ \text{mmol/L NaCl}$, $5\ \text{mmol/L KCl}$, $1\ \text{mmol/L MgCl}_2$ 。柠檬酸钠- NaCl 缓冲液 (pH 7.0, $1\times$ Trisodium citrate/ NaCl , $1\times$ SSC), $15\ \text{mmol/L}$ 柠檬酸三钠 $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), $150\ \text{mmol/L NaCl}$ 0.005% SDS。

2.2 玻片的处理

将载玻片切割成尺寸为 $2.5\ \text{cm} \times 1.5\ \text{cm}$ 长方块, 置于 $80\ ^\circ\text{C}$ 恒温槽中, 用新配制的 Piranha 溶液 ($V_{\text{H}_2\text{O}_2} : V_{\text{H}_2\text{SO}_4} = 3 : 7$) 浸泡 1 h, 依次用大量超纯水、乙醇将残留酸液洗净, N_2 吹干, 于 $110\ ^\circ\text{C}$ 烘箱中干燥 3 h, 洗净玻片以作备用。

2.3 液晶盒基底的制备

上玻片: 将洗净玻片浸入 0.2% (w/w) DMOAP 水溶液中, 硅烷化 10 min, 超纯水洗净, N_2 吹干, $110\ ^\circ\text{C}$ 干燥 1 h, 备用。

下玻片: 将玻片置于 5% (w/w) APTES 和 1% (w/w) DMOAP 混合溶液中, 于 $80\ ^\circ\text{C}$ 下混合组装 1 h, 超纯水洗净, N_2 吹干, $110\ ^\circ\text{C}$ 干燥 1 h。氨基功能化的玻片基底以作备用。

2.4 核酸适体的固定

核酸适体的预处理: 为了使核酸适体形成稳定的二级结构, 将 $100\ \text{nmol/L}$ PDGF-BB 核酸适体于 $90\ ^\circ\text{C}$ 下热变性 5 min, 然后迅速放入冰水浴中快速冷却^[13], 于 $4\ ^\circ\text{C}$ 保存备用。

氨基化的玻片浸泡在 2% (w/w) 戊二醛溶液中, 于室温下反应 1 h, 超纯水洗净。将已淬火的核酸适体滴加在经醛基修饰的下玻片上, $37\ ^\circ\text{C}$ 下反应 2 h, $1\times$ SSC 洗液冲洗, 超纯水洗净, N_2 吹干备用。核酸适体即可通过戊二醛的偶联作用固定在下玻片上。

2.5 PDGF-BB 的特异性反应

室温下, 用 $80\ \text{mmol/L}$ 甘氨酸溶液封闭玻片上未反应的醛基后, 将不同浓度的 PDGF-BB 溶液滴加在修饰过核酸适体的玻片上, 于 $37\ ^\circ\text{C}$ 下特异性结合 1 h, 分别用缓冲液和超纯水洗净, N_2 吹干, 备用。

2.6 液晶盒的制作和光学图像的采集

将上、下两块玻片面对面组合, 两玻片之间用开孔 Mylar 聚酯膜隔开。用夹子固定除开孔方向的其他 3 个边缘, 即形成一个含有凸型空腔的液晶盒。取少许液晶加热至 $40\ ^\circ\text{C}$, 使液晶相变为各向同性的液态。将液晶从开孔处注入, 由于毛细管作用, 液晶布满整个空腔。冷却至室温, 各向同性的液态液晶转变成向列型的液晶态, 并在组装膜的诱导下呈定向排列。用偏光显微镜观察并采集图像进行分析。

3 结果与讨论

3.1 检测原理

原理如图 1 所示。首先, 在洗净的玻片基底表面硅烷化一层 APTES/DMOAP 混合自组装膜。其中, DMOAP 具有十八烷基链能够诱导液晶分子在空间取向上垂直排列, 产生全黑的偏光显微图像, 而 APTES 具有氨基官能团, 通过戊二醛的偶联作用可将氨基化的捕获探针 PDGF-BB 核酸适体固定于 APTES/DMOAP 修饰的玻片基底上。靶分子 PDGF-BB 与其核酸适体发生特异性作用后能有效的结合于传感基底表面, 核酸适体作为传感器的识别元件与 PDGF-BB 特异性结合时, 其构象由不稳定的单通道螺旋结构向稳定的三通道螺旋结构转变^[14, 15]。利用 PDGF-BB 蛋白的空间尺寸效应对液晶分子有序排列的干扰, 改变液晶分子对偏正光的折射行为, 导致偏光图像的亮度和色彩发生变化, 从而实现 PDGF-BB 的快速检测; 当未加入 PDGF-BB 时, 由于低组装密度的核酸适体对液晶垂直有序排列的扰乱

作用较小,可观察到呈现均一黑色的偏光图像。

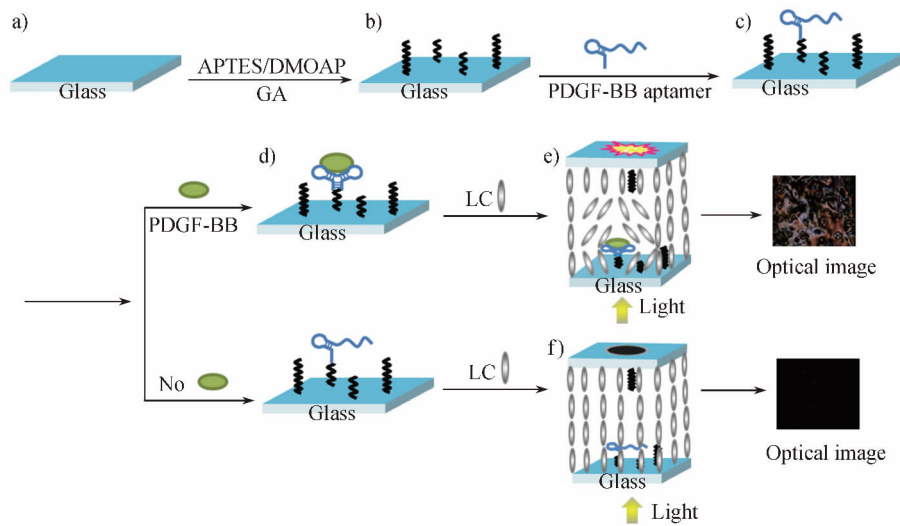


图 1 液晶生物传感的组装过程

Fig.1 Stepwise assembly of liquid crystal (LC) biosensing substrate

(a) 玻片 (b) 在玻片表面修饰 3-氨基三乙氧基硅烷/*N,N*-二甲基-*N*-十八烷基 [3-(三甲氧基硅基) 丙基] 氯化铵 (APTES/DMOAP) 混合自组装膜 (c) 血小板源性生长因子 BB (Platelet-derived growth factor BB , PDGF-BB) 核酸适体的固定 (d) PDGF-BB 与 PDGF-BB 核酸适体的特异性结合 ,(e) 特异性结合 PDGF-BB 后液晶分子呈现倾斜排列 (f) PDGF-BB 不存在时液晶分子呈现垂直排列。

(a) Glass slide , (b) self-assembled (3-aminopropyl) trimethoxysilane/*N,N*-dimethyl-*N*-octadecyl (3-aminopropyl) trimethoxy-silyl chloride (APTES/DMOAP) film , (c) immobilization of the platelet-derived growth factor BB (PDGF-BB) aptamer , (d) specific binding of PDGF-BB , (e) tilted orientation of 4-cyano-4'-pentylbiphenyl (5CB) in the LC cells after the specific binding of target PDGF-BB , and (f) perpendicular orientation of 5CB in the LC cells in the absence of PDGF-BB.

3.2 下玻片 APTES/DMOAP 比例的优化

为了降低混合自组装表面的背景信号,考察了不同质量分数比的 APTES/DMOAP 对液晶盒基底的影响。如图 2A ~ C 所示,光学图像的白色亮点随着 APTES/DMOAP 质量分数比的降低而减少。当 APTES/DMOAP 的质量分数比降低至 5:1 时,光学图像几乎呈现均一黑色的(图 2D),表明 DMOAP 能有效的诱导液晶垂直排列,形成有序的液晶池。因此,选取质量分数为 5:1 的 APTES/DMOAP 混合液自组装硅烷化下玻片,用于固定 PDGF-BB 核酸适体。

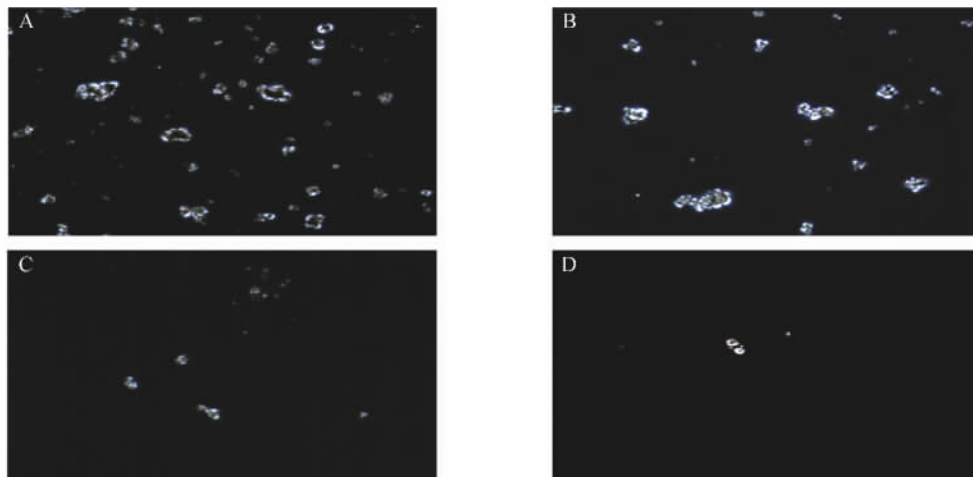


图 2 APTES/DMOAP 混合自组装膜的液晶光学信号图

Fig.2 LC optical responses of APTES/DMOAP-decorated glass slide

APTES/DMOAP 的质量分数比(APTES-DMOAP ratios (*w/w*)): (A) 20:1 ,(B) 15:1 ,(C) 10:1 ,(D) 5:1.

3.3 PDGF-BB 核酸适体浓度的优化

液晶生物传感的偏光信号变化与基底表面组装的核酸适体密度有关,为了提高液晶生物传感的信噪比,对 PDGF-BB 核酸适体的浓度进行了优化。如图 3A ~ C 所示,当核酸适体的浓度为 600, 300 和 200 nmol/L 时,光学图像由彩色织构条纹区域向黄白亮区转变,这是由于高密度的核酸适体导致液晶分子空间取向排列为无序排列,改变液晶分子对偏正光的折射能力,引起光学图像的颜色和光亮度发生变化,不利于提高液晶生物传感的信噪比。当核酸适体浓度为 100 nmol/L 或者更低的浓度时,低密度的核酸适体对液晶的取向排列影响较小,形成有序的液晶池,光学图像呈现均一的黑色(图 3D)。为使 PDGF-BB 蛋白能有效的结合于传感基底表面,故选用 PDGF-BB 核酸适体的浓度为 100 nmol/L。

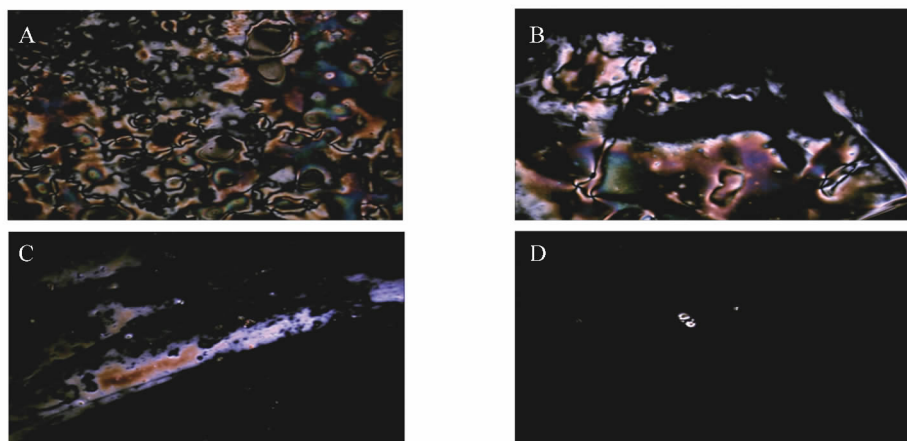


图 3 PDGF-BB 核酸适体的液晶光学信号图。核酸适体的浓度为:(A) 600 nmol/L,(B) 300 nmol/L,(C) 200 nmol/L,(D) 100 nmol/L

Fig. 3 LC optical responses of PDGF-BB aptamer. Concentrations of aptamer are: (A) 600 nmol/L, (B) 300 nmol/L, (C) 200 nmol/L and (D) 100 nmol/L

3.4 PDGF-BB 的检测及其核酸适体构象变化的分析

PDGF-BB 与其核酸适体发生特异性作用后能有效的结合于传感基底表面,核酸适体作为传感器的识别元件其构象在与 PDGF-BB 特异性结合时会发生改变。通过观察液晶生物传感的偏光信号图像变化与荧光强度大小对 PDGF-BB 的识别以及核酸适体的构象变化进行了验证。由图 4A ~ C 可知,当 PDGF-BB 的浓度为 50, 25 和 10 nmol/L,偏光显微镜下呈现彩色织构条纹光学图像,这是由于结合在传

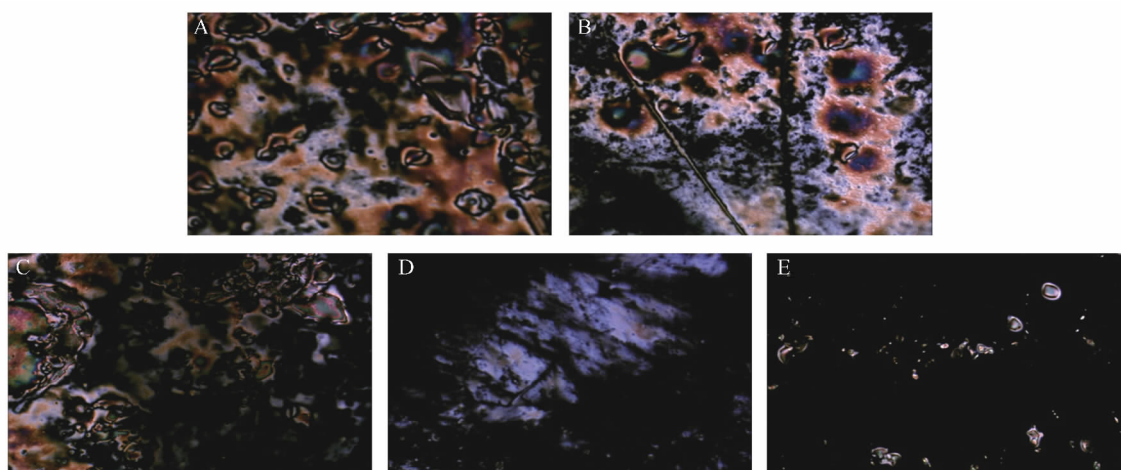


图 4 液晶生物传感对 PDGF-BB 蛋白的光学信号图。PDGF-BB 浓度分别为:(A) 50 nmol/L,(B) 25 nmol/L,(C) 10 nmol/L,(D) 5 nmol/L,(E) 1 nmol/L

Fig. 4 Optical responses of LC biosensor to PDGF-BB protein. Concentrations of PDGF-BB are: (A) 50 nmol/L, (B) 25 nmol/L, (C) 10 nmol/L, (D) 5 nmol/L and (E) 1 nmol/L

感基底表面的 PDGF-BB 密度较大,其空间尺寸效应扰乱液晶分子的取向排列作用大,双折射现象明显,引起光学图像的颜色和光亮度发生变化。当 PDGF-BB 浓度低至 5 nmol/L 时,仍有明显的光学信号响应,图像呈现黄白亮区(图 4D),而当 PDGF-BB 浓度为 1 nmol/L 时,其光学图像只含有少量的亮点(图 4E)这说明当 PDGF-BB 的浓度为 1 nmol/L 时,固定在传感基底表面的 PDGF-BB 密度较小,扰乱液晶有序排列的作用小,光学图像变化不明显。为了验证核酸适体的构象变化是由 PDGF-BB 引起的,进一步采用荧光实验进行表征。利用 SYBR Green I (SG) 荧光染料对单链、双链 DNA 的嵌入能力不同以及嵌入前后荧光发射强度不同的特性^[16,17],根据荧光强度变化可区别核酸适体的构象变化。实验结果如图 5 所示,溶液中只存在 PDGF-BB (5 nmol/L) 或只存在核酸适体 (100 nmol/L) 时,几乎无荧光信号(图 5a) 或荧光强度很弱(图 5b)。但 PDGF-BB 与核酸适体特异性结合后,荧光值显著增强(图 5c, 5d),这是由于 PDGF-BB 的加入有助于核酸适体由单通道螺旋结构向稳定的三通道螺旋结构变化,核酸适体的碱基互补数目随之增多,嵌入的 SG 数量也相应增加,故荧光强度会显著提高。实验表明,当 PDGF-BB 的浓度不低于 5 nmol/L 时,仍可以观察到明显的液晶光学信号以及荧光强度改变,显示了良好的检测灵敏度。

3.5 液晶生物传感的选择性

为了检验液晶生物传感的选择性,分别考察了液晶对 PDGF-BB、BHb、BSA 和 Thrombin 的偏光信号变化(浓度均为 50 nmol/L)。结果如图 6 所示。PDGF-BB 的光学图像呈现明显的彩色织构区域(图 6A),而对照组中 BHb、BSA、Thrombin 的光学图像中除有少数亮点外,其它部分仍为黑色图像(图 6B~D)。实验表明,基于核酸适体的液晶生物传感对 PDGF-BB 的检测具有良好的选择性。

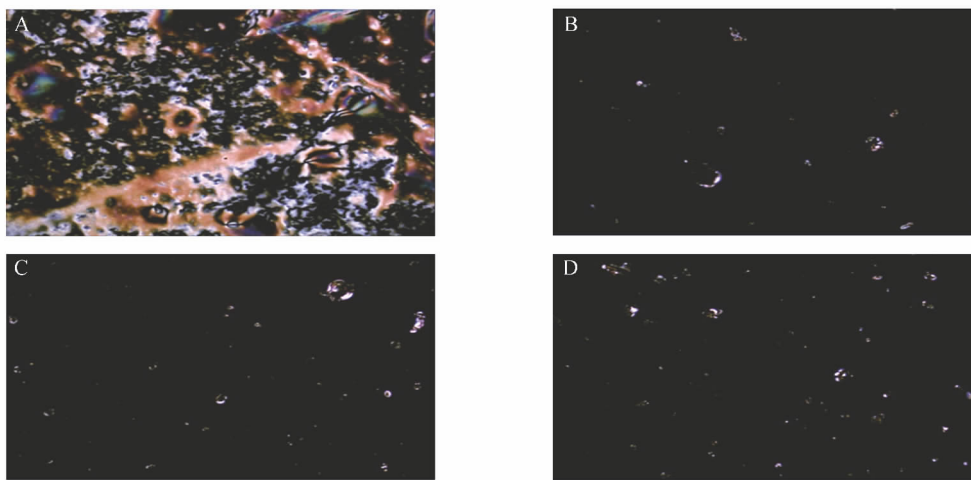


图 6 液晶生物传感对不同蛋白质的光学信号图。蛋白质分别为: (A) PDGF-BB, (B) BHb, (C) BSA, (D) Thrombin

Fig. 6 Optical responses of LC biosensors to different proteins. (A) PDGF-BB, (B) Bovine hemoglobin (BHb), (C) BSA and (D) Thrombin. The concentration of proteins was 50 nmol/L

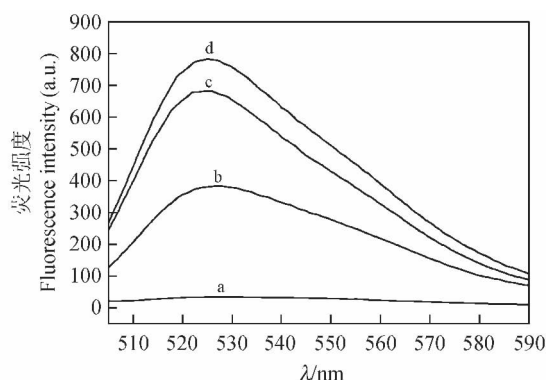


图 5 SYBR Green I (SG) 对 PDGF-BB 蛋白与 PDGF-BB 核酸适体的荧光谱图

Fig. 5 Fluorescence responses of SYBR Green (SG) to the PDGF-BB protein and the PDGF-BB aptamer

- (a) 10 nmol/L PDGF-BB; (b) 100 nmol/L PDGF-BB 核酸适体; (c) 5 nmol/L PDGF-BB, 100 nmol/L PDGF-BB 核酸适体; (d) 10 nmol/L PDGF-BB, 100 nmol/L PDGF-BB 核酸适体
(a) 10 nmol/L PDGF-BB; (b) 100 nmol/L PDGF-BB aptamer; (c) 5 nmol/L PDGF-BB, 100 nmol/L PDGF-BB aptamer; (d) 10 nmol/L PDGF-BB, 100 nmol/L PDGF-BB aptamer

4 结 论

根据生物大分子,特别是蛋白质分子能有效扰乱液晶分子有序排列的原理,建立了基于液晶取向改变的以核酸适体为捕获探针,用于检测 PDGF-BB 大分子的新型液晶生物传感方法。本方法采用尺寸较小的核酸适体作为传感器的识别元件,尺寸更大的 PDGF-BB 蛋白与核酸适体特异性结合于传感基底表面,由于大尺寸 PDGF-BB 蛋白能有效扰乱液晶分子的有序排列,进而导致偏光图像色彩发生显著的变化,实现了液晶生物传感对 PDGF-BB 的快速检测。这种新型液晶生物传感具有无需标记、操作简单、成本低、灵敏度高等特点,可望应用于更多生物大分子的检测。

References

- 1 Tan H, Yang S Y, Shen G L, Yu R Q, Wu Z Y. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49(46): 8608-8611
- 2 Yang S Y, Liu Y M, Tan H, Wu C, Wu Z Y, Shen G L, Yu R Q. *Chem. Commun.*, **2012**, 48(23): 2861-2863
- 3 ZHANG Guo-An, XU Xue-Jiao, ZHANG Su-Yan, FAN Hui-Zhi, YANG Peng-Yuan. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2003**, 31(5): 611-618
张国安,许雪姣,张素艳,樊惠芝,杨芃原. *分析化学*, **2003**, 31(5): 611-618
- 4 WANG Hong-Xia, XIA Qing, LI Ping, HE Jia-Tian, WANG Jie, ZHANG Xue-Min. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2006**, 34(3): 321-324
王红霞,夏晴,李萍,何佳田,王杰,张学敏. *分析化学*, **2006**, 34(3): 321-324
- 5 ZHU Jing, HUANG Yong, JIANG Xiao-Ping, TAN Zhong-Yang, JIANG Jian-Hui, SHEN Guo-Li, YU Ru-Qin. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2009**, 37(11): 1596-1600
朱静,黄勇,蒋小平,谭钟扬,蒋建辉,沈国励,俞汝勤. *分析化学*, **2009**, 37(11): 1596-1600
- 6 Kim S R, Shah R R, Abbott N L. *Anal. Chem.*, **2000**, 72(19): 4646-4653
- 7 Brake J M, Abbott N L. *Langmuir*, **2007**, 23(16): 8497-8507
- 8 Hammacher A, Hellman U, Johnsson A. *J. Biol. Chem.*, **1988**, 263(31): 16493-16498
- 9 Atkinson S, Fox S B. *J. Pathol.*, **2004**, 203(2): 721-728
- 10 Yeh H J, Silos-Santiago I, Wang Y X, George R J, Snider W D, Deuel T F. *P. Natl. Acad. Sci. USA.*, **1993**, 90(5): 1952-1956
- 11 Hart C E, Bailey M, Curtis D A, Osborn S, Raines E, Ross R, Forstrom J W. *Biochem.*, **1990**, 29(1): 1660-172
- 12 Zhou C S, Jiang Y X, Hou S, Ma B, Fang X H, Li M L. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2006**, 384(5): 1175-1180
- 13 Liss M, Petersen B, Wolf H, Prohaska E. *Anal. Chem.*, **2002**, 74(17): 4488-4495
- 14 Green L S, Jellinek D, Jenison R, Ostman A, Heldin C H, Janjic N. *Biochem.*, **1996**, 35(45): 14413-14424
- 15 Ruslinda A R, Penmatsa V, Ishii Y, Tajima S, Kawarada H. *Analyst*, **2012**, 137(7): 1692-1697
- 16 LUAN Rui-Bo, YANG Xiao-Hai, WANG Ke-Min. *Life Science Research*, **2006**, 10(2): 113-117
栾瑞波,羊小海,王柯敏. *生命科学研究*, **2006**, 10(2): 113-117
- 17 LIU Xin, XU Gen-Ming, GUO Jiang-Feng, DING Xian-Feng, GAO Xiao-Lian. *China Biotechnology*, **2008**, 28(1): 55-60
刘歆,徐根明,郭江峰,丁先锋,高晓莲. *中国生物工程杂志*, **2008**, 28(1): 55-60

Aptamer-Based on Liquid Crystal Biosensor for Determination of Platelet-derived Growth Factor BB

LI Xia, TAN Hui, LI Yun-Lei, WU Zhao-Yang*, SHEN Guo-Li, YU Ru-Qin

(State Key Laboratory of Chemo/Biosensing and Chemometrics, College of Chemistry and Chemical Engineering,
Hunan University, Changsha 410082, China)

Abstract A novel liquid crystal (LC) biosensor was developed for the detection of platelet-derived growth

