

- [3] 张志达, 江晓兵, 沈耿杨, 等. 磷酸钙及硫酸钙支架在骨组织工程中的研究进展 [J]. 中国组织工程研究, 2016, 20 (8): 1203-1209.
- [4] 马新芳, 张静莹. 骨组织工程支架材料的研究现状与应用前景 [J]. 中国组织工程研究, 2014, 18 (30): 4895-4899.
- [5] Shen Y, Yang S, Liu J, et al. Engineering scaffolds integrated with calcium sulfate and oyster shell for enhanced bone tissue regeneration [J]. ACS Appl Mater Interfaces, 2014, 6 (15): 12177-12188.
- [6] Han X, Wu X, Liu H, et al. Ectopic osteogenesis of an injectable nHAC/CSH loaded with blood-acquired mesenchymal progenitor cells in a nude mice model [J]. J Mater Sci Mater Med, 2015, 26 (1): 5338.
- [7] Depan D, Shah J, Misra R. Degradation mechanism and increased stability of chitosan-based hybrid scaffolds cross-linked with nanostructured carbon: process-structure-functional property relationship [J]. Polym Degrad Stabil, 2013, 98 (11): 2331-2339.

• 基础研究 •

基于多重信号放大的 miR-135b 电化学传感器的制备及效果评价

福建省福州市第二医院 (福州 350007) 陈冬冬¹ 林佳生¹ 严伟¹ 张韬²

【摘要】 目的 通过“多重信号放大策略”构建一种 miR-135b 电化学传感器, 并将其用于骨肉瘤标志物 miR-135b 的检测, 考察其应用价值。方法 设计高特异性茎环捕获探针 (CP) 并进行末端氨基修饰, 再采用 L-赖氨酸通过循环伏安电聚合法在电极表面形成一层纳米膜, 将捕获探针与修饰电极通过共价键相连后, 通过 T-7 核酸外切酶实现靶序列 (TP) 循环, 再通过辅助探针 AP1 和 AP2, 使得捕获探针、辅助探针 AP1 和 AP2 三者通过 DNA 纳米长距自组装技术进行级联杂交, 从而在电极表面形成“三明治”DNA 双链形态的 miR-135b 电化学传感器, 并用其检测骨肉瘤、良性骨肿瘤及健康对照组人群血清中的 miR-135b。结果 成功构建了一种基于“多重信号放大策略”的 miR-135b 电化学传感器, 其检测峰电流值与 miR-135b 浓度的对数在 $1.0 \sim 1.0 \times 10^4$ pmol/L 范围内成正比, 检出限 (S/N=3) 为 0.52 pmol/L, 具备良好的稳定性、重现性和特异性, 在检测人血清时具有良好的灵敏性。结论 成功构建了一种基于“多重信号放大策略”的 miR-135b 电化学传感器, 其检测限低, 准确性好, 作为骨肉瘤患者的大规模筛查和连续动态检测具有重大的现实意义。

【关键词】 miR-135b; 电化学传感器; 多重信号放大策略; 骨肉瘤

【中图分类号】 R44 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2019)05-0125-03

近些年, 虽然骨肉瘤的治疗获得了较大的发展, 但由于其早期极易发生肺转移, 故患者 5 年整体生存率低于 30%, 所以骨肉瘤的早期诊断是疾病治疗的关键^[1]。生物传感器是利用生物特异性对生物分子进行特异性识别与反应并进行检测的新一代生物检测技术, 在肿瘤标志物的快速检测方面得到了迅猛发展^[2]。本研究拟利用 microRNA 的结构特点, 设计高特异性茎环捕获探针 (CP) 并进行末端氨基修饰, 再采用 L-赖氨酸通过循环伏安电聚合法在电极表面形成一层纳米膜, 将捕获探针与修饰电极通过共价键相连后, 通过 T-7 核酸外切酶实现靶序列 (TP) 循环, 再通过辅助探针 AP1 和 AP2 形成“多重信号放大”, 从而实现对骨肉瘤特异性标记物 microRNA-135b 的灵敏检测, 为骨肉瘤的早期临床诊断奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料: 三电极 (玻碳电极、饱和甘汞电极、铂丝电极) 系统 (北京仪电科技有限公司); T7 核酸外切酶 (美国 Hy-clone 公司); 聚 L-赖氨酸、 Al_2O_3 粉 (国药集团化学试剂有限公司)、探针成环溶液 (宝生物工程 (大连) 有限公司); 磷酸盐 (PBS) 缓冲溶液 (美国 Sigma)。

1.2 实验方法:

1.2.1 miR-135b 高特异性茎环 (HP) 捕获探针及辅助探针 AP1、AP2 的设计: 从 miRNA 数据库 miRBase (<http://microrna.sanger.ac.uk/>) 中查找 miR-135b 序列, 按照 DNA 互补原则得到其茎环识别探针的环部。然后, 将上述环部 DNA 序列和启动区 DNA 序列相结合, 选用文献 [3] 中提供的茎环二级结构预测系统, 从而设计出 miR-135b 的最适茎环识别探针, 再根据 miR-135b HP 捕获探针设计出辅助探针 AP1、AP2。本实验使用的所有探针 DNA 序列均由上海生工生物技术有限公司合成, 其序列如下:

表 1 所用探针的 DNA 序列

| 序列名称 | 碱基序列 |
|--------------|--|
| 目标探针 (TP) | 5'-CTC AAT AAG CAA AAT GGG TTA CCC TAG GGT AAA AA-3' |
| 捕获探针 (CP) | 5'-TATGGGTAA CCC TTA TTG AG-NH-3' |
| 辅助探针 1 (AP1) | 5'-TTA CCC ATA GGG TAA TTA TAA CCC TTA GGC-3' |
| 辅助探针 2 (AP2) | 5'-TTA CCC TTA CCC TTA GCC AAT GGG TTA TAA-3' |

基金项目: 2016 年福建省自然科学基金面上项目 (2016J01594); 2015 年福州市临床重点专科建设项目 (骨科)

1 骨病骨肿瘤科; 2 骨科研究所, 通信作者, Email: james155@foxmail.com

1.2.2 聚 L-赖氨酸修饰电极的制备：将粒度为 1 000 的金相砂纸用水浸润，然后用其将直径为 3 mm 的玻璃碳电极磨光，用 Al₂O₃ 抛成镜面后分别用 50% HNO₃、无水乙醇及蒸馏水进行超声波清洗，清洗频率为 10 min/次，晾干后将电极放入 pH=9.0、浓度为 6.0×10⁻³ mol/L 的 L-赖氨酸的 PBS 溶液中，在 -0.8~2.4 V 电位内，用 130 mV/S 扫速循环扫描 10 周后，用蒸馏水清洗电极的表面，自然晾干后备用。

1.2.3 miR-135b 电化学传感器的制备：将聚 L-赖氨酸修饰电极倒置，取 3.2 μL 0.5 μM 捕获探针 (CP) 溶液滴涂于聚 L-赖氨酸修饰电极表面，37 °C 恒温水浴 2 h，然后用 BSA 蛋白缓冲液对捕获探针修饰后的电极表面的“剩余位点”进行封闭，缓冲液洗去未连接的茎环探针，室温密闭过夜，超纯水冲洗干净后采用氮气进行吹干。然后取 3.2 μL 0.5 μM 目标探针 (TP) 溶液滴涂于上述电极表面，37 °C 恒温水浴 2 h，同样采用超纯水洗涤、氮气吹干。最后将 3.2 μM 辅助探针混合溶液 (AP1+AP2) 滴涂于上述处理电极表面，37 °C 恒温水浴 4 h 进行 DNA 长距自组装，组装完成后超纯水冲洗、氮气吹干后即制得 miR-135b 电化学传感器。

1.2.4 miR-135b 电化学传感器检测条件的确定：

1.2.4.1 生物识别作用时间的确定：将上述开发的 miR-135b 电化学传感器置于 50 μmol/L 的 miR-135b 溶液中，采用差分脉冲伏安法 (DPV) 进行测定，测定时间分别设为 10 min、20 min、30 min、40 min、50 min，观察峰电流的变化。

1.2.4.2 miR-135b 电化学传感器检测限的确定：在确定 miR-135b 电化学传感器生物作用时间的条件下，分别测定 0 pmol/L、1 pmol/L、2 pmol/L、10 pmol/L、1×10² pmol/L、1×10³ pmol/L、1×10⁴ pmol/L、1×10⁵ pmol/L 的 miR-135b 溶液，记录峰电流。

1.2.4.3 miR-135b 电化学传感器的稳定性：将制备好的 miR-135b 电化学传感器置于 50 μmol/L 的 miR-135b 溶液中，连续测定 3 次，记录峰电流的变化。

1.2.4.4 miR-135b 电化学传感器的重现性：将平行制备的 5 支 miR-135b 电化学传感器插入 50 μmol/L 的 miRNA 溶液中，读取峰电流。

1.2.4.5 miR-135b 电化学传感器的选择性：将此 miR-135b 电化学传感器分别置于 50 μmol/L miR-135b 及混合溶液 (包括 25 μmol/L miR-21、50 μmol/L miR-135b、10 μmol/L miR-141) 中，记录混合溶液和 miR-21 的峰电流结果差。

1.2.5 miR-135b 电化学传感器在骨肉瘤患者血清中的应用：选取骨肉瘤患者 50 例、良性骨肿瘤组 50 例、健康对照组 50 例，受检者早晨空腹，用肝素抗凝管抽取其静脉血 5 mL，经抗凝处理，部分静脉血离心取血清，采用 miR-135b 电化学传感器检测血清中的 miR-135b 含量。

1.3 统计学方法：结果采用 SPSS 11.0 统计学软件进行分析，多次测量结果均以均值±标准差表示，组间比较采用 *t* 检验，以 *P*<0.05 认为结果有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-135b 电化学传感器的构建及检测原理：见图 1。首先，在电极表面修饰一层纳米结构膜，将茎环 DNA 探针 (P) 组装到电极表面。当目标序列 T1 存在时，T1 与 P 杂交形成 RNA/DNA 双链结构，此时 T7 核酸外切酶从 5'→3' 方向逐步降解 P 至 RNA/DNA 双链降解完全，剩余未杂交部分会残留于在电极表面。此时，被释放的 T1 则又与另一条 P 再次杂交。如此循环往复，理论上来说一条 T1 在 T7 核酸外切酶的辅助下就能使所有的 P 被降解。在完成上述步骤后，P 将从 RNA/DNA 结合的发夹结构变成短线性结构，然后通过辅助探针 AP1、AP2 以级联式杂交的方式在聚 L-赖氨酸修饰电极的表面形成长距超级“三明治”结构，结合大量的指示剂，产生较强的电信号。若 T1 不存在，虽然 AP1、AP2 也可自组装成长距 DNA 双链，但由于 P 的茎环结构无法打开，与 AP1 连接不上，因此不能连接到聚 L-赖氨酸修饰电极的表面，此时电极表面只有 P，只能

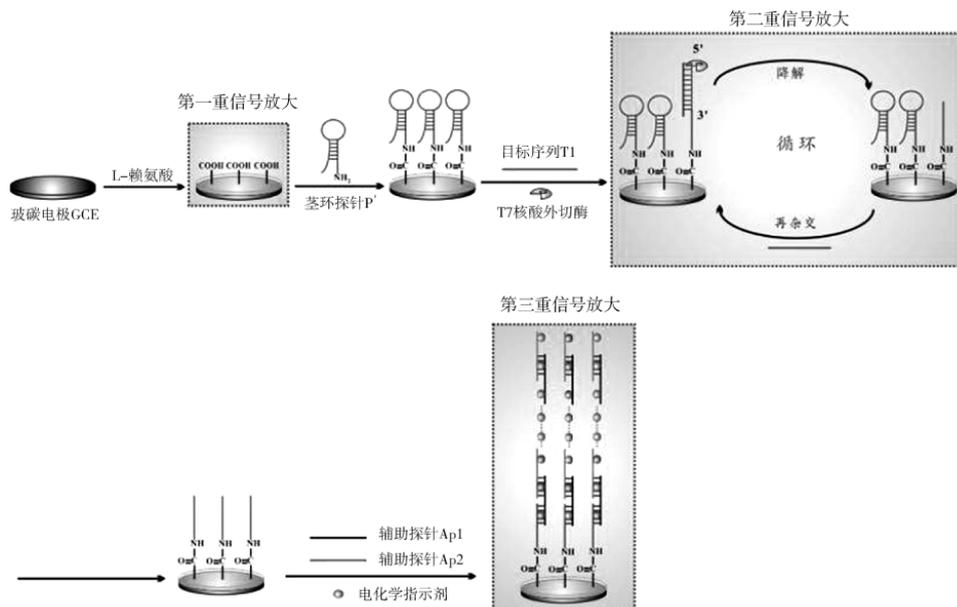


图 1 miR-135b 电化学传感器的构建及检测原理图

与微量的指示剂进行结合,产生的电信号就会十分的微弱,由此通过比较 T1 加入前后电信号的差异可实现对目标序列的超低微量检测。

2.2 生物识别作用时间的确定:本研究测定了 miRNA 电化学传感器不同生物识别时间的峰电流值,结果表明,随着生物识别作用时间的逐步增加,峰电流值呈现逐步升高的趋势,当生物识别作用时间达到 30 min 后,峰电流维持稳定,说明 30 min 为 miR-135b 与捕获探针完全反应的最佳生物识别作用时间。见表 2。

表 2 不同生物识别作用时间测定的峰电流值

| 峰电流值/ μA | 作用时间/min | | | | |
|---------------------|----------|-------|-------|-------|----|
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 |
| 20.35 | 37.31 | 55.84 | 56.12 | 55.98 | |

2.3 miRNA 电化学传感器检测限的确定:将制备好的 miRNA 传感器置于不同梯度浓度的 miR-135b 溶液中,结果表明,随着 miR-135b 浓度的增加,其峰电流逐渐增加,检测峰电流值与 miR-135b 浓度的对数在 $1.0 \sim 1.0 \times 10^4$ pmol/L 范围内成正比,最低检测浓度 ($S/N=3$) 为 0.52 pmol/L。

2.4 miRNA 电化学传感器的稳定性:用制备好的 miRNA 传感器连续测定 miR-135b 溶液 3 次,结果表明 3 次测定的峰电流基本无变化,其相对标准偏差 (RSD, $n=30$) 为 0.79%,同时制备了无聚 L-赖氨酸修饰的 miRNA 传感器作为对照,同样进行 3 次测定,结果表明 3 次测定的峰电流有明显变化,相对标准偏差 (RSD, $n=3$) 为 3.55%,说明制备的传感器稳定性良好。见表 3。

表 3 不同修饰电极测定的峰电流值

| 峰电流值/ μA | 聚 L-赖氨酸 miRNA 传感器 | | | 无聚 L-赖氨酸 miRNA 传感器 | | |
|----------------------|----------------------|-------|-------|-----------------------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 1 | 2 | 3 |
| | 55.62 | 54.96 | 56.03 | 53.96 | 57.72 | 50.63 |
| 相对标准偏差 (RSD, $n=3$) | 0.79% | | | 3.55% | | |

2.5 miR-135b 电化学传感器的重现性:平行制备的 5 支 miR-135b 电化学传感器测定结果见表 4,其相对标准偏差 (RSD, $n=5$) 为 0.93%,提示该传感器具有良好的重现性。

表 4 不同支电极测定的峰电流值

| 峰电流值/ μA | 电极编号 | | | | |
|----------------------|-------|-------|-------|-------|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 55.47 | 54.98 | 56.02 | 54.11 | 54.46 | |
| 相对标准偏差 (RSD, $n=5$) | 0.93% | | | | |

2.6 miR-135b 电化学传感器的特异性:miR-135b 电化学传感器测定 miR-135b 及混合溶液的结果显示其电流响应结果差 (ΔI) 为 0.03 μA ,说明此传感器特异性良好。

2.7 miR-135b 电化学传感器在骨肉瘤患者血清检测中的应

用:采用 miR-135b 电化学传感器检测骨肉瘤、良性骨肿瘤及健康对照人群血清中的 miR-135b 含量,结果见表 5,骨肿瘤组的峰电流值与良性肿瘤组、健康对照组相比,差异均有统计学意义 (P 值均 <0.05),表明 miRNA 传感器在检测骨肉瘤患者血清溶液中的 miR-135b 时具有良好的灵敏性,有助于骨肉瘤患者的早期诊断。

表 5 不同检测方法测得的骨肉瘤患者血清溶液 miR-135b 浓度

| | 骨肉瘤组 | 良性骨肿瘤组 | 健康对照组 |
|---------------------|------------------|-----------------|-----------------|
| 峰电流值/ μA | 22.34 ± 4.38 | 5.11 ± 1.41 | 4.86 ± 1.39 |
| t 值* | | 6.879 | 5.618 |
| P 值* | | <0.05 | <0.05 |

注: * 与骨肉瘤组比较。

3 讨论

骨肉瘤作为一种常见的、发生在 20 岁以下青少年或儿童的恶性骨肿瘤,在小儿骨恶性肿瘤中的比例达到了 5%。目前,骨肉瘤的影像学检查由于存在难以检测的盲区,且价格昂贵、耗时,难以大规模推广;活体组织检查则由于其创伤性及假阴性,亦难广泛应用。因此,骨肉瘤新诊断方法的开发已变得越发紧迫。

生物传感器是利用生物特异性对生物分子进行特异性识别与反应并进行检测的新一代生物检测技术,然而,目前的一些生物传感器也存在着探针设计繁琐、检测特异性差、易受环境影响、稳定性差等缺陷,因此,有必要继续开发新的电化学生物传感器。近年来,随着核酸酶研究的深入,仅“切割”一条单链的核酸酶应用得越来越广泛,这些酶能够提供等温条件下类似 PCR 循环的过程,这一过程可用于检测特定 DNA 序列。基于此种“酶辅助信号放大法”,学者们构建了很多新型的高灵敏、高特异性的 DNA 电化学生物传感器^[4-6],尤其是 DNA 自组装技术的发展,更进一步促进了 DNA 电化学生物传感器的快速发展。

因此,我们通过“多重信号放大策略”成功构建了一种骨肉瘤特异性标记物 microRNA-135b 的 miRNA 传感器检测系统,该系统检测的峰电流值与 miR-135b 浓度的对数在 $1.0 \sim 1.0 \times 10^4$ pmol/L 范围内成正比,最低检测浓度 ($S/N=3$) 为 0.52 pmol/L,具备良好的稳定性、重现性和特异性,在检测人血清时具有良好的灵敏性。其创新点在于此系统特别针对小儿骨恶性肿瘤的现实情况,采用电化学检测方法发展便携式、灵敏、快速、廉价的三重信号放大的电化学生物传感器,用于骨肉瘤的早期诊断,能实现全国范围内,尤其是经济欠发达地区的骨肉瘤大规模筛查和连续动态检测。同时,由于该传感器是基于对血液样本检测的一种非创伤性检测技术,可以最大限度地减少对患者身体和心理上所造成的损害,具有广阔的应用前景。

参考文献

- [1] Guijarro M V, Ghivizzani C S, Gibbs P C. Animal models in osteosarcoma [J]. Front Oncol, 2014, 5 (17): 224-230.

(下转第 139 页)

(上接第 127 页)

- [2] 文军. 生物传感器在水质监测上的应用探析 [J]. 资源节约与环保, 2019, 3 (5): 42.
- [3] Zadeh J N, Steenberg C D, Bois J S, et al. NUPACK: Analysis and design of nucleic acid systems [J]. Journal of computational chemistry, 2011, 32 (1): 170-173.
- [4] Federica D, Prakash K, Virgilio B, et al. Absolute and direct microRNA quantification using DNA-gold nanoparticle probes [J]. Analytical Chemistry, 2014, 86 (6): 2264-2267.
- [5] Wang S, Fu B, Wang J, et al. Novel amplex red oxidases based on noncanonical DNA structures: property studies and applications in microRNA detection [J]. Analytical Chemistry, 2014, 86 (6): 2925-2930.
- [6] 张静, 章溪, 汪世华, 等. 基于靶序列循环及 DNA 长距自组装的电化学传感器用于乳腺癌相关序列 c-erbB2 的检测 [J]. 分析测试学报, 2013, 32 (12): 1409-1414.