

• 临床研究 •

便携式血糖仪联合血管内皮生长因子适配体传感系统的构建及其在骨肉瘤诊断中的应用

福建省福州市第二医院骨科一区 (福州 350007) 严 伟 陈冬冬 陈 嵘¹

【摘 要】 目的 通过将血糖仪和血管内皮生长因子 (VEGF) 适配体传感器相结合, 构建一种便携式适配体传感系统, 并将其用于骨肉瘤标志物的检测。**方法** 将血糖仪作为检测器, 与适配体传感器相结合, 开发出一种便携式血糖仪联合 VEGF 适配体传感系统, 在对其反应条件 (孵育时间、反应时间、存储时间) 进行优化的基础上测定了其检测限。同时, 选取 10 份骨肿瘤患者血清进行检测, 通过与传统的 ELISA 法进行比较, 评估其准确度。**结果** 成功构建了一种便携式血糖仪联合 VEGF 适配体传感系统, 其最佳孵育时间 60 min、反应时间 30 min、存储时间 7 h, 最低检测限为 6.5×10^{-9} mol/L (2.58 μ g/kg)。该法用于骨肉瘤患者血清的检测, 与 ELISA 法检测结果差异无统计学意义 ($t=2.322$, $P>0.05$)。**结论** 成功构建了一种便携式血糖仪联合 VEGF 适配体传感系统, 并将其运用到骨肉瘤患者血清检测, 其检测限低, 准确性好。

【关键词】 VEGF 适配体; 便携式血糖仪; 骨肉瘤

【中图分类号】 R738.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2020)02-0033-04

Construction on sensing system of portable blood glucose meter combined with osteosarcoma protein marker aptamer and its application in diagnosis of osteosarcoma YAN Wei, CHEN Dongdong, CHEN Rong. Department of Orthopaedics, Fuzhou Municipal Second Hospital, Fuzhou, Fujian 350007, China

【Abstract】 Objective To construct a portable aptamer sensing system by combining a blood glucose meter with a vascular endothelial growth factor (VEGF) aptamer sensor, and use it for the detection of osteosarcoma markers. **Methods** A portable blood glucose meter combined with a VEGF aptamer sensing system was developed, which was determined on the basis of optimizing its reaction conditions (incubation time, reaction time, storage time). At the same time, ten serum samples from bone tumor patients were selected for testing, and their accuracy was evaluated by comparing with traditional ELISA methods. **Results** A portable blood glucose meter combined with a VEGF aptamer sensing system was successfully constructed. The optimal incubation time was 60 minutes, the reaction time was 30 minutes, and the storage time was 7 hours. The minimum detection limit was 6.5×10^{-9} mol/L (2.58 μ g/kg). This method was used for the detection of serum in patients with osteosarcoma which was not statistically significant difference with ELISA method ($t=2.322$, $P>0.05$). **Conclusion** A portable blood glucose meter combined with a VEGF aptamer sensing system is successfully constructed and applied to detect serum of osteosarcoma patients. Its low detection limits and accuracy was good.

【Key words】 VEGF aptamer; portable blood glucose meter; osteosarcoma

骨肉瘤好发于股骨远端和胫骨近端等血运丰富的长骨干骺端, 是威胁儿童和青少年生命健康的最常见的恶性骨肿瘤。有调查数据显示, 骨肉瘤患者的 5 年生存率约为 53.9%^[1], 有 20% 左右的骨肉瘤患者在确诊时已出现肺内转移^[2]。因此, 在骨肉瘤早期, 对其进行及早发现和诊断对挽救患者生命具有重要意义。目前, 最常用的骨肉瘤诊断方法有影像学检查和活体组织检查。这些方法价格昂贵、耗时, 难以推广应用于大规模的骨肉瘤普查。因此, 研究一种经济、简便, 且准确、灵敏的无创检

测新技术, 对骨肉瘤的早期诊断具有重要的意义。本项目拟通过将血糖仪和血管内皮生长因子 (VEGF) 适配体传感器相结合, 构建一种便携式适配体传感系统用于骨肉瘤的检测, 并对其检测条件进行优化, 同时考察其检测效果。

1 材料与方法

1.1 材料: VEGF 适配体及其互补 DNA 由大连生物公司合成, 其序列分别为 5'-CCATACCG-GACGCCTAAACCGACCGTAGAAAAA-AAAA-3' 及 5'-CGGATAAACGGATAAAAAA-

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目 (2016J01595); 2017 年福建省级临床重点专科建设项目 (骨科)

¹ 通信作者, Email: chenrong_fjz@126.com

AAAAA-3'; 纳米磁珠由东莞市磁丰电子有限公司提供; 蔗糖、蔗糖酶由山西宝瑞生物科技有限公司提供; 磁分离器购自 Bangs Laboratories 公司提供; 血糖仪 (型号 ACCU-CHEKActive) 由罗氏公司提供。

1.2 方法:

1.2.1 DNA 分子与蔗糖酶分子的活化: 1) 蔗糖酶分子的活化: 取 320 μL 25 mg/mL 蔗糖酶溶液, 将其与 1 μL 缓冲液 B (buffer B) 溶液进行震荡混匀。取 1 mg 4- (N-马来酰亚胺甲基) 环己烷-1-羧酸磺基琥珀酰亚胺酯钠盐 (sulfo-SMCC), 将其加入到蔗糖酶及 buffer B 混合溶液中, 恒温震荡 15 min 后将混合物放置于恒温混匀仪上, 在室温条件下反应 3 h 以使蔗糖酶分子活化。活化完成后将混合溶液置于高速冷冻离心机中, 12 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min 后取上清液备用。2) 互补 DNA 分子的活化: 取 1.5 mL 的 Eppendorf 管, 依次加入 50 μL 200 $\mu\text{mol/L}$ 互补 DNA 溶液、1 μL 0.2 mol/L 的 buffer B 溶液、2 μL 30 mmol/L 用超纯水配置的三 (2-羧乙基) 膦 (TCEP) 溶液, 震荡混匀 5 min 后, 同样放置于恒温混匀仪上, 在室温条件下反应 2 h 以使互补 DNA 分子活化。活化完成后按照 1) 中方法离心取上清液备用。

1.2.2 DNA-蔗糖酶聚合物的合成: 将 1.2.1 中的蔗糖酶活化上清液及互补 DNA 活化上清液, 分别加入到 Amicon-100K 及 Amicon-3K 超滤管中, 置于高速离心机中, 12 000 r/min、室温条件下分别离心 10 min。用 1 mL buffer A 进行洗涤数次, 然后将洗涤后的两种活化液从超滤管转移到 1.5 mL 的 Eppendorf 管中, 涡旋混匀 1 min, 取混合液置于恒温混匀仪上, 在室温条件下反应 48 h 以合成 DNA-蔗糖酶聚合物。最后, 转入 Amicon-100K 超过滤器中进行进一步离心、洗涤。

1.2.3 DNA-蔗糖酶在磁球上的固定: 1) 磁球和 VEGF 适配体的连接: 购买的纳米磁珠采用 0.5 mL 2 mg/mL 的链霉亲和素进行修饰, 修饰完成后将磁球置于磁分离器中进行分离, 待澄清完全后移除上清液, 然后用 buffer B 洗涤 2 次后备用。取 60 μL 0.1 mmol/L 的 VEGF 适配体溶液, 将其加入到前述磁球溶液中进行轻微涡旋混匀, 同样置于恒温混匀仪上, 室温条件下反应 1 h 后, 用 1 mL buffer B 进行反复洗涤。2) DNA-蔗糖酶在磁球上的固定: 取 1.2.2 中的 DNA-蔗糖酶聚合物, 将其转移到磁球-VEGF 适配体溶液中, 轻微涡旋混匀

后置于恒温混匀仪上进行固定, 反应温度为 25 $^{\circ}\text{C}$, 时间为 1 h。反应结束后用 buffer B 溶液反复洗涤后即可得到 DNA-磁球-蔗糖酶聚合物, 即 VEGF 适配体传感器。

1.2.4 便携式血糖仪联合 VEGF 适配体传感系统反应条件的确定: 1) 便携式血糖仪联合 VEGF 适配体传感系统孵育时间的确定: 取 60 μL 1.2.3 中的 VEGF 适配体传感器与 60 $\mu\text{mol/L}$ (A 组) 和 120 $\mu\text{mol/L}$ (B 组) 的 VEGF 溶液混合, 室温条件下分别孵育 0、20、40、60、80 min, 然后将溶液置于磁分离器中进行分离。分离完全后各组分别吸取上清液 10 μL , 加入到含有 5 μL 用 buffer B 溶液配制的浓度为 2 mol/L 的蔗糖溶液的离心管中, 混合均匀, 在室温条件下继续反应 30 min。反应完全后取 5 μL 溶液用便携式血糖仪进行检测。2) 便携式血糖仪联合 VEGF 适配体传感系统反应时间的确定: 取 1) 中最佳孵育时间进行孵育、磁分离, 然后与蔗糖溶液分别反应 0、10、20、30、40 min, 其余步骤与 1) 同。3) 便携式血糖仪联合 VEGF 适配体传感系统存储时间的确定: 在确定了孵育时间及反应时间的情况下, 取 VEGF 适配体传感器在 4 $^{\circ}\text{C}$ 时分别保存 2、4、6、8、10 d 后再按照上述步骤进行检测。

1.2.5 便携式血糖仪联合 VEGF 适配体传感系统检出限的确定: 取浓度分别为 0、0.01、0.05、0.1、0.5、1、2、4 $\mu\text{mol/L}$ 的 VEGF (buffer B) 溶液与 VEGF 适配体传感器进行混合, 采用优化后的反应条件进行测定, 步骤同 1.2.4。

1.2.6 便携式血糖仪联合 VEGF 适配体传感系统定量检测骨肿瘤患者血清中的 VEGF: 随机选取 2018—2019 年间我院收治的四肢骨肉瘤患者血清 10 份进行检测, 其中男 6 例, 女 4 例, 平均年龄 (15.88 \pm 3.42) 岁, 本研究经医院伦理委员会批准, 患者及其家属均签署知情同意书。所有受检者早晨空腹用肝素抗凝管抽取静脉血 5 mL, 经抗凝处理, 部分静脉血离心取血清, 稀释成不同浓度 (0、1、2、4、6.25、12.5、25、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$) 的 VEGF (buffer B) 溶液, 采用 1.2.4 优化后的便携式血糖仪联合 VEGF 适配体传感系统进行测定。传统方法检测则将部分静脉血离心后的血清采用 ELISA 试剂盒测定 VEGF 水平, 测定步骤需严格遵循试剂盒说明书。

1.3 统计学方法: 采用 SPSS 19.0 对实验结果进行分析, VEGF 水平以均数 \pm 标准差表示, 两组测

定方法检测 VEGF 水平的比较采用两样本 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 便携式血糖仪联合 VEGF 适配体传感系统技术路线图: 适配体生物传感系统的技术路线图见图 1。携带有亲和素标记的磁珠会与携带有生物素标记的 VEGF 适配体的一端进行结合, 从而将 VEGF 适配体固定到磁珠上, 此时标记有蔗糖酶的 DNA 探针就会利用碱基互补配对产生的氢键作用力将互补 DNA 与 VEGF 适配体连接, 从而也固定到磁珠的表面, 形成适配体生物传感系统。当待测液体中存在待测目标分子 VEGF 时, 其就与适配体特异性结合, 从而使携带有蔗糖酶标记的 DNA 探针完整释放, 然后利用磁铁即可将探针从上述复杂体系中分离出来。在探针溶液中加入蔗糖, 在蔗糖酶的催化下形成葡萄糖, 利用血糖仪检测生产的葡萄糖含量及蔗糖酶的量与样品中目标分子的量之间的比例关系来实现体系中目标蛋白的检测, 最终通过血糖仪的读数表现出来^[3]。

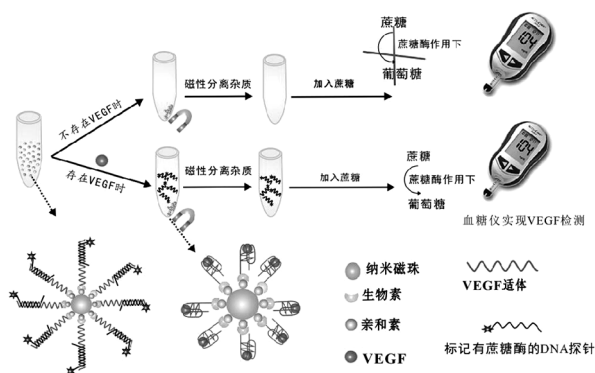


图 1 便携式血糖仪联合 VEGF 适配体传感系统技术路线图

2.2 便携式血糖仪联合 VEGF 适配体传感系统反应条件的确定:

2.2.1 孵育时间的确定: 结果见图 2, 随着孵育时间的增加, 血糖仪信号值不断升高, 当孵育时间在 60 min 时, 血糖仪信号值已基本维持稳定, 表明此时蔗糖酶已经基本释放完全, 因此选择 60 min 作为孵育时间。

2.2.2 反应时间的确定: 结果见图 3, 随着反应时间的增加, 血糖仪信号值不断升高, 在 0~40 min 内血糖仪信号值与反应时间基本保持线性关系。为了保证有显著的检测信号及准确性, 反应时间确定为 30 min。

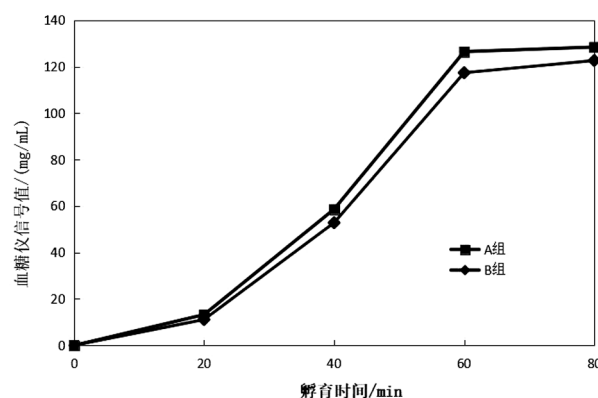


图 2 传感器不同孵育时间的血糖仪信号值

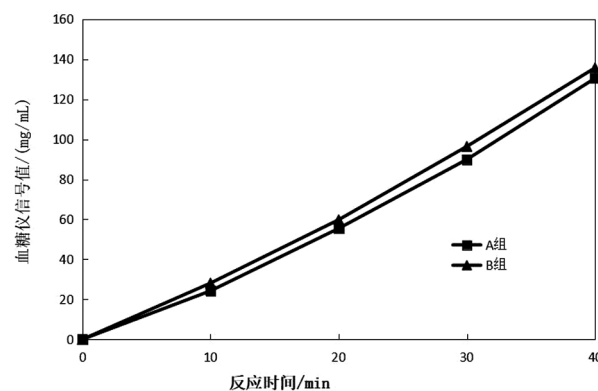


图 3 传感器不同反应时间的血糖仪信号值

2.2.3 存储时间的确定: 结果见图 4, 当存储时间达到 8 d 时, 血糖仪读数基本稳定, 蔗糖酶已经基本全部释放, 为了保证蔗糖酶完全释放, 选择 7 d 作为存储时间。

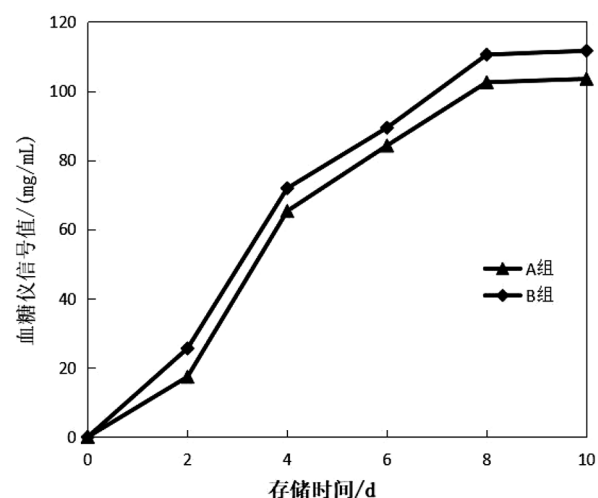


图 4 传感器不同存储时间的血糖仪信号值

2.3 VEGF 与血糖仪读数回归方程及检测限的确定: 从结果可知, 血糖仪信号值与 VEGF 浓度有较

好的线性比例,拟合其回归方程为: $Y=0.452\ 2X+0.152\ 1$, $R^2=0.989\ 4$ 。其中 X 是 VEGF 浓度, Y 是血糖仪示数, R 是回归系数,计算出其最低检出限为 $6.5\times 10^{-9}\text{ mol/L}$ ($2.58\ \mu\text{g/kg}$)。

2.4 便携式血糖仪联合 VEGF 适配体传感系统定量检测骨肿瘤患者血清中的 VEGF: 便携式传感器检测 VEGF 的平均浓度为 $(113.44\pm 15.37)\text{ pg/mL}$, ELISA 法为 $(126.59\pm 14.85)\text{ pg/mL}$, 两组之间比较,差异无统计学意义 ($t=2.322$, $P>0.05$)。

3 讨论

近年来,科学工作者们发现了一种可取代抗体作为肿瘤标记物的识别分子的物质—适配体。适配体是通过指数富集配体系统进化技术 (SELEX) 筛选得到的一类单链或双链寡核苷酸,其能特异性识别和结合蛋白类及其他小分子物质,长度一般为 15~40 个核苷酸。有研究数据^[4]表明,适配体和靶分子之间相互作用的表面积较大,即使目标分子发生了微小的变化也可能破坏与适配体的结合。因此,适配体与靶分子之间的结合具有高度专一性。

近年来,随着体外筛选技术的发展和 PCR 技术的应用,适配体的研究有了长足的进步并广泛应用于生物医学领域,特别是在肿瘤标记物的检测方面,适配体的应用也为生物传感器用于早期肿瘤诊断提供了一个新的思路。Kim 等^[5]筛选出了 RNA 适配体 SE15-8,并成功用于 ErbB2 阳性的乳腺癌细胞的检测。匡红等^[6]构建了一种基于纳米金信号放大技术的适配体等离子体共振 (SPR) 传感器微阵列用于检测血小板源性生长因子 (PDGF)。Li 等^[7]建立了一种无标记的电化学适配体传感器用于血管内皮生长因子 (VEGF165) 的超微量检测。最成功的传感器是血糖仪,它是一种医用仪器,可以实时监控血液中葡萄糖浓度,具有价格便宜、精密度高、操作简便、便于携带等特点,这种仪器已经用于普通百姓家庭。

本项目利用便携式血糖仪作为检测器,通过将适配体、互补 DNA、蔗糖酶及标记物等连接到纳米磁珠上,成功开发出了一种便携式适配体传感器

用于骨肉瘤蛋白标志物的分析,使得人们可以直接通过血糖仪的读数来定量检测骨肉瘤标志物的浓度,从而像监测血糖一样监测骨肉瘤标志物。本研究的便携式血糖仪联合 VEGF 适配体传感系统,其最佳孵育时间 60 min,反应时间 30 min,存储时间 7 d,其最低检测限为 $6.5\times 10^{-9}\text{ mol/L}$ ($2.58\ \mu\text{g/kg}$),在用于骨肉瘤患者血清的检测中与 ELISA 法检测结果差异无统计学意义,说明这便携式血糖仪联合 VEGF 适配体传感系统检测限低,准确性好。笔者认为,通过适体与目标蛋白间的相互作用,引起与适体互补的 DNA 单链上标记的酶或转化物催化产生葡萄糖,利用血糖仪对葡萄糖的定量分析,从而对骨肉瘤蛋白标志物进行间接的检测。这为骨肉瘤早期快速准确的检测奠定了前期基础,为将来家用型的骨肉瘤早期诊断仪器的构建提供理论和技术支持,具有重要的现实意义及广泛的应用前景。

参考文献

- [1] 黄旭方,仲津漫,赵妮妮,等. 细胞 SELEX 技术用于胰腺癌细胞特异性适配体的筛选及鉴定 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2018, 34 (6): 642-648.
- [2] Seok Y, Byun J Y, Shim W B, et al. Astructure-switchable aptasensor for a flatoxin B1 detectionbased on assembly of an aptamer/split DNAzyme [J]. Anal Chim Acta, 2015, 886 (7): 182-187.
- [3] 翁艳,陈冬冬,涂少臣. Cell-SELEX 筛选人骨肉瘤细胞 MG-63 核酸适配体的实验研究 [J]. 福建医药杂志, 2018, 40 (2): 111-114.
- [4] 吕正兵. 生物工程制药学 [M]. 北京: 科学出版社, 2012: 197.
- [5] Kim M Y, Jeong S. In vitro selection of RNA aptamer and specific targeting of ErbB2 in breast cancer cells [J]. Nucleic Acid Ther, 2011, 21 (3): 173-178.
- [6] 匡红,曾琳,刘书蓉,等. 纳米金信号放大的 SPR 适配体生物传感器快速检测血小板源性生长因子的研究 [J]. 检验医学与临床, 2015, 12 (1): 16-18.
- [7] Li Z, Xue N, Ma H, et al. Anultrasensitive and switch-on platform for a flatoxinB1 detection in peanut based on the fluorescencequenching of graphene oxide-gold nanocomposites [J]. Talanta, 2018, 181 (6): 346-351.