

磁弛豫开关技术在生物检测应用中的研究进展

张锦胜, 吴斌, 邹灯超, 金玲, 胡立文

(南昌大学中德食品工程中心, 江西南昌 330047)

摘要: 本文主要介绍磁弛豫开关技术在生物检测应用中的研究进展。磁弛豫开关检测技术是核磁共振技术、纳米技术和生物免疫技术相结合的一种灵敏度高、特异性好、抗干扰能力强的快速检测技术。以修饰了生物配体的磁性纳米颗粒作为磁共振探针, 该探针能特异识别某一物质, 当与待测物发生特异性结合后, 磁性纳米颗粒由分散态变成聚集态, 使得水质子的横向弛豫时间(T_2)发生改变, 从而实现对待测物的检测。目前磁弛豫开关技术已经广泛应用于蛋白质、微生物、核酸、小分子等生物分子的检测, 并取得了一定的成果。基于磁学信号的磁弛豫开关检测技术具有抗干扰能力强, 适用于复杂基质检测的特点, 使得该技术在食品安全、环境检测、临床诊断等领域都有着广阔的应用前景。

关键词: 磁弛豫开关; 生物检测; 磁性纳米颗粒

文章编号: 1673-9078(2018)12-264-271

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.12.039

The Research Progress of Magnetic Relaxation Switch Technology in Biological Detection Applications

ZHANG Jin-sheng, WU Bin, ZOU Deng-chao, JIN Ling, HU Li-wen

(Sino-german Food Engineering Center Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: The research progress of magnetic relaxation switch technology in biological detection applications was introduced in this paper. The magnetic relaxation switch detection technology is a rapid detection technology with high sensitivity, good specificity and strong anti-interference ability combining nuclear magnetic resonance technology, nanotechnology with immunoassay technology. The magnetic nanoparticles modified with the biological ligand are used as magnetic resonance probe, which can identify a substance specifically. When specifically combined with the analyte, the magnetic nanoparticles change from dispersed state to aggregated state, the transverse relaxation time (T_2) of the Water proton is changed to realize the detection of the analyte. At present, magnetic relaxation switch detection technology has been widely used in the detection of biomolecules such as proteins, microorganisms, nucleic acids, and small molecules, and has made some achievements. In addition, the magnetic relaxation switch detection technology based on magnetic signal has strong anti-interference ability and is suitable for complex component detection, which makes the technology has a broad application prospect in food safety, environmental detection, clinical diagnosis and other fields.

Key words: magnetic relaxation switches; biological detection; magnetic nanoparticles

近年来, 一种基于磁弛豫开关 (Magnetic Relaxation Switch, MRS) 技术的生物分子检测方法受到了广泛的关注。该方法是通过水质子弛豫时间的变化来判断待测物的有无。而影响磁弛豫开关技术在生物检测过程中弛豫信号变化的主要因素是磁性纳米粒子, 因此, 有关磁性纳米粒子的生物传感器也得到了越来越多的研究^[1-4]。磁性纳米颗粒表面含有许多化学键, 通过静电/共价修饰生物配体 (抗体、核酸等),

收稿日期: 2018-08-08

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31860467); 江西省自然科学基金项目 (20151BBG70049)

作者简介: 张锦胜 (1971-), 博士, 副教授, 研究方向: 食品科学与食品安全

能特异性识别目标物, 可作为检测目标物的探针。通过对纳米颗粒的磁核组成、粒径和磁学性能进行调控, 使得纳米粒子已经广泛应用于各种生物传感器中^[5]。迄今为止, 已经发展了许多使用磁性标记物检测生物分子的方法^[6], 主要分为两大类, 一种是基于纳米颗粒本身的效应直接检测, 例如基于巨磁阻效应 (Giant Magnetoresistive, GMR) 的 GMR 传感器^[7,8]和基于弛豫原理的超导量子干涉仪 (Superconducting Quantum Interference Device, SQUID)^[9]。另外一种是基于磁性纳米颗粒对弛豫时间 (T_1/T_2) 的影响而间接测定。在磁共振成像 (Magnetic Resonance Imaging, MRI) 技术中, 磁性纳米粒子用作造影剂, 可增强正常组织和病变组织之间的信号差异, 结合 MRI 用于疾病的早期

诊断^[10,11]；与生物配体结合制备成传感器探针，当有目标物存在时，目标物和探针相互作用使颗粒由分散态变成聚集态，引起周围水分子转动时相位差发生变化，造成水分子的横向弛豫时间 T_2 变化，基于 T_2 的变化可实现对目标物的检测。磁弛豫开关技术检测的是磁学信号，而一般的生物样品磁学信号基本可以忽略，因此该检测方法有效的避免了复杂基质的干扰，适用于成分复杂、浑浊的生物样品的直接测定。同时，该技术涉及的免疫反应为均相反应体系，无需固液分离，减少了传统酶联免疫中的洗板和显色等步骤，缩短检测时间^[12]。目前磁弛豫开关技术已经广泛应用于蛋白质^[13-15]、微生物^[16]、核酸^[17]、小分子^[18]等生物分子的检测；在医疗诊断、食品安全，环境分析等领域也都有着广泛的用途。本文主要从磁性纳米探针与待测物结合后，对水质子弛豫时间的影响方面综述了磁弛豫开关技术在生物检测应用中的研究进展。

1 磁性材料的弛豫特性

生物传感器中使用的磁性材料主要分为三类，第一类是金属氧化物，如 FeO 、 Fe_3O_4 、 Fe_2O_3 、 Co_3O_4 ；第二类是金属材料，如过渡金属元素中的镍，能同时表现出优良的磁学性能和催化活性；第三类是合金，如 $\text{Fe}_{56}\text{Co}_7\text{Ni}_7\text{B}_{20}\text{Nb}_{10}$ ，是一种无定形态结构，能同时综合各种金属的磁学性能^[19]。磁弛豫开关技术中使用的磁性纳米材料主要是铁的氧化物，包括 Fe_3O_4 、 Fe_2O_3 、 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 。磁性材料尺寸达到纳米级后就会表现出顺磁性或超顺磁性，即纳米粒子在场强为 H 的外加磁场中，纳米粒子会被磁化，对外表现出磁性，磁化强度 M 与 H 的关系为， $M=\chi H$ ， χ 为物质的磁化率。外加磁场撤出之后，纳米粒子的净磁矩为零，对外不表现出磁性。这种现象产生的原因是纳米颗粒由单畴组成，单个磁畴的磁矩取向不同，正好相互抵消，使总磁矩为零。同时，在外加磁场中，每个磁纳米颗粒都会产生一个很大的磁偶极子，由此产生的局部磁场梯度引起外部磁场的均匀性。当水分子通过此不均匀磁场时，其质子会加速弛豫，引起弛豫时间 T_1/T_2 变化^[20]，而该变化可以通过核磁共振（NMR）技术量化。对大多数磁性纳米颗粒而言，横向弛豫率 r_2 显著大于纵向弛豫率 r_1 ，故基于弛豫时间的传感器中，一般测定的都是 T_2 的变化。磁性纳米材料的弛豫特性不仅与纳米材料本身的弛豫率有关，而且还与纳米材料的存在状态相关，如纳米粒子由分散态变成聚集状态的时候，横向弛豫率加强，引起横向弛豫时间 T_2 的变化^[21]。

2 磁弛豫开关检测技术的原理

磁弛豫开关^[22]是 Weissleder 课题组在 2001 年发现，该课题组设计了四种模型，对该现象进行进一步研究，包括 DNA-DNA、蛋白质-蛋白质、蛋白质-小分子和酶的催化^[12]。研究发现，在这四种分子的相互作用下，纳米粒子都会聚集，从而导致横向弛豫时间 T_2 的变化，这四种模型的建立为各种生化样品的分析奠定了基础。磁弛豫开关技术中制备传感器使用的磁性颗粒包括纳米颗粒（ $d=1\sim 100\text{ nm}$ ）和微米颗粒（ $d=250\sim 5000\text{ nm}$ ），根据纳米颗粒和微米颗粒聚集引起横向弛豫时间的改变的不同，分为 I^[23,24]型和 II^[25]型，即纳米颗粒聚集会使 T_2 减少，微米颗粒聚集会使 T_2 增加。针对这两种现象，国外有学者提出著名的“球外扩散理论”^[26,27]，诠释了产生这两种现象的原因。“球外扩散理论”中有两个比较重要的参数，第一个是 D_w ，磁性颗粒表面赤道线处质子和内部质子所处局部场强之间的角频率差， $D_w=m_0 M g/3$ ， m_0 -真空磁导率， M -颗粒磁化强度， g -质子的磁旋比。第二个参数是 t_D ，球周围水分子的扩散时间， $t_D=Ra^2/D$ ， Ra -球体半径， D -水分子扩散系数。纳米粒子的平均运动条件满足 $t_D D_w < 1$ ，横向弛豫时间 T_2 降低。微米粒子的平均运动情况满足 $t_D D_w > 1$ ，故随着微米粒子的聚集表现出 T_2 增加的现象^[28-30]。

3 磁弛豫开关检测技术在生物检测应用中的

研究进展

3.1 磁性颗粒的生物学修饰

磁性颗粒的生物学修饰是磁弛豫开关技术检测生物分子的前提，将生物亲和分子修饰到磁性颗粒的表面，赋予其识别目标物的能力。磁性颗粒生物学修饰的方法有很多，大体上分为直接修饰和间接修饰。直接修饰又分为物理吸附和共价偶联。物理吸附是指蛋白质等生物亲和分子和纳米材料间的疏水作用和静电作用；共价偶联是指在纳米颗粒的表面修饰硫化物、氨基或羧基，通过这些基团与生物亲和分子之间形成共价键从而实现纳米颗粒的生物学修饰^[31,32]。间接修饰则需要一对具有强亲和力的分子，比如生物素-亲和素，链霉亲和素-生物素。先用亲和素/链霉亲和素包被纳米材料，再将需要检测的生物亲和分子标记生物素，通过亲和素/链霉亲和素和生物素间接达到修饰磁性颗粒的目的。

3.2 磁性颗粒由分散状态变成聚集态的方式及其应用

表 1 磁弛豫开关技术在生物样品检测中的应用

Table 1 Summary of the application of MRS technology in the detection of biological samples

聚集类型	磁性颗粒探针	目标物	检测限	传感器类型	参考文献
抗原-抗体 反应	纳米粒子-抗体	β -hCG	3.6 nmol/L	I	[34]
	纳米粒子-抗体	PSA	13.7 ng/mL	I	[35]
	纳米粒子-叶酸	叶酸	3 nmol/L	I	[36]
	纳米粒子-HA	HA	50 nmol/L	I	[36]
	微米磁性颗粒-流感肽段	流感肽段	NR	II	[36]
	Fe ₃ O ₄ -抗体	阪崎肠杆菌	1.1 M4PN	I	[16]
	Fe/Fe ₃ O ₄ -抗体	单增李斯特菌	3 MPN	I	[39]
黏附素-受体	纳米粒子-抗体	肠沙门氏菌	10 ³ CFU/mL	I	[41]
	Fe ₃ O ₄ -右旋糖苷	AGP	0.66 nmol/L	I	[43]
	微米磁性颗粒- α 甘露糖苷	ConA	NR	II	[44]
DNA 互补 序列	微米磁性颗粒- α 甘露糖苷	GNL	NR	II	[44]
	纳米粒-SS-(CH ₂) ₆ -CGC-ATT-CAG-GAT	纳米粒子-SS-(CH ₂) ₃ -ATG-CTC-AACTCT	NR	I	[22]
	纳米粒子-TCACAGATGAGT	Pb ²⁺	0.05 ng/mL	I	[45]
	纳米粒子-CACGAGTTGACA	结核杆菌目标 DNA	10 ³ CFU/mL	NR	[17]
配位化合物	微米粒子-CTTGCGCTTCCTCTGCTTCA	纳米粒子-CCGCGGTTTCGCTTCGACGTGAAGACCG			
	纳米粒子				
	Fe ₃ O ₄ -胸苷	Hg ²⁺	NR	I	[48]
亲和素/链 霉亲和素- 生物素	(Zn, Mn) Fe ₃ O ₄ -ETC	Cd ²⁺	3.5 nmol/L	I	[49]
	Au-Fe ₃ O ₄ -ETC	Cd ²⁺	2.6 μ mol/L	I	[50]
	生物素-IHPFHLVIHTK-生物素	肾素	NR	I	[52]
	纳米磁性颗粒-亲和素	胰蛋白酶	NR	I	[52]
其它方式	生物素-(G)4RRRR(G)3-生物素	MMP-2	NR	I	[52]
	纳米磁性颗粒-亲和素	卡那霉素	0.1 ng/mL	I	[53]
	生物素-GGPLGVRGR-生物素	金黄色葡萄球菌	NR	I	[55]
	纳米磁性颗粒-卡那霉素抗体				
	纳米磁性颗粒-万古霉素				

注: β -hCG, 人绒毛膜促性腺激素; PSA, 前列腺特异性抗原; HA, 流感血凝素肽; AGP, 酸性糖蛋白; ConA, 伴刀豆蛋白 A; GNL, 雪花凝集素; MMP-2, 基质金属蛋白酶 2; NR, 没有报道。

磁性颗粒生物学修饰后能特异识别某一物质, 引起磁性颗粒的状态由分散状态变成聚集状态, 使得横向弛豫时间 T₂ 改变。根据引起磁性颗粒由分散状态变成聚集状态的原因可以分为, 抗原-抗体、凝集素-受体、DNA 互补序列、配位化合物、亲和素/链霉亲和素-生物素及其它方式。

目前应用更广泛的是磁性纳米颗粒, 因此也就成为人们研究的主要对象。图 1 主要介绍抗原-抗体、凝集素-受体、DNA 互补序列、配位化合物引起的磁性纳米颗粒的聚集方式。表 1 总结了磁弛豫开关技术在生物样品检测中的应用。

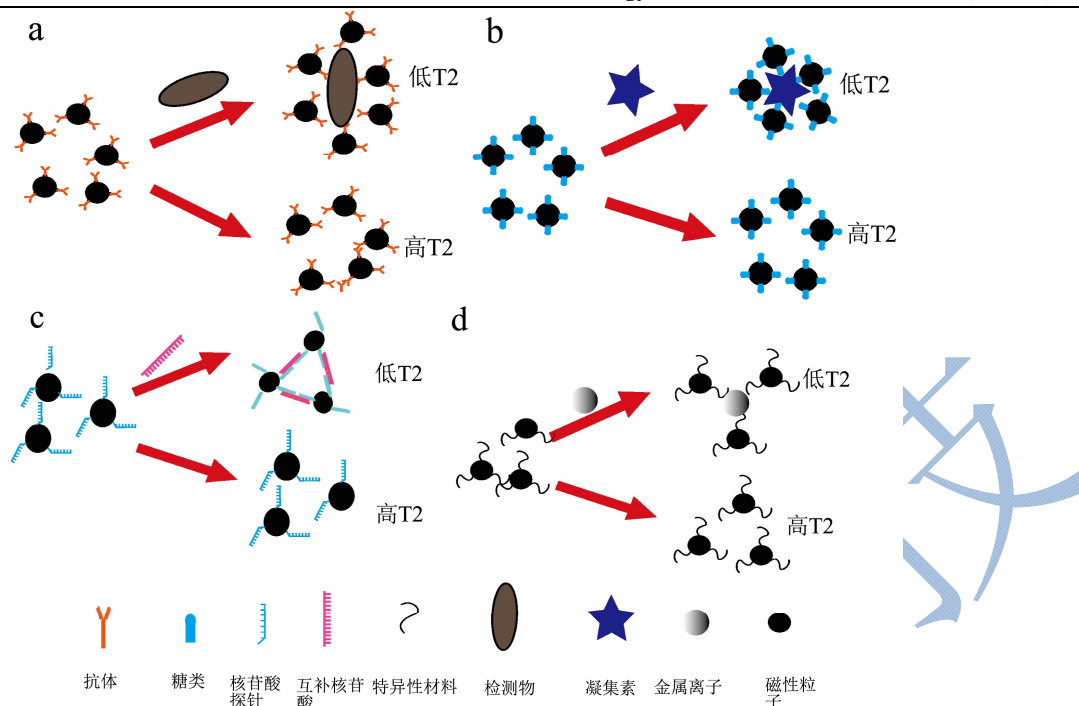


图1 磁性纳米颗粒聚集的方式

Fig.1 Types of magnetic nanoparticles aggregation

注: a: 抗原-抗体反应; b: 凝集素-受体反应; c: DNA 互补序列; d: 配位化合物。

3.2.1 抗原-抗体

基于抗原-抗体之间的特异性反应是使磁性颗粒由分散态变成聚集态最常用的方式,已被广泛用于大分子蛋白、小分子、致病菌的检测^[33]。基于抗原-抗体之间的相互作用引起磁性颗粒聚沉最初由Weissleder^[5]等人发表在Nature biotechnology上。Perez^[12]等人将绿色荧光蛋白(Green Fluorescent Protein, GFP)的抗体修饰到磁性纳米颗粒上,加入GFP时,纳米粒子由分散态变成聚集态, T_2 降低的多少与其加入量和反应的时间相关。该方法检测灵敏度高,检测限能达到纳摩尔级。Grace^[34]等人利用磁共振传感技术定性和定量分析人绒毛膜促性腺激素(human Chorionic Gonadotrophin, hCG),用于前列腺癌和卵巢癌的早期诊断。人绒毛膜促性腺激素的配对抗体通过共价键修饰到磁性纳米颗粒上,加入目标物后,配对抗体特异性识别目标物上的抗原,形成一个双抗夹心结构,即“纳米粒子-C95-hCG-C9-纳米粒子”,引起纳米粒子聚集,检测限达到3.6 nmol/L。该技术结合芯片技术可以实现快速,高通量的检测,Cai^[35]等以聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)为材质研制了小型、高通量的芯片成像单元,结合磁共振成像仪(MRI)对18个样品同步分析,仅需26 min。

小分子物质表面含有的抗原比较少,在检测时利用竞争性免疫反应检测其含量,这种方法首先用于叶酸和流感血凝素肽的检测^[36]。首先,将需要检测的小

分子修饰到磁性纳米颗粒表面,分别加入叶酸和流感血凝素肽的抗体,磁性颗粒由分散态变成聚集态,这时加入的叶酸和流感血凝素肽与磁性颗粒上的叶酸和流感血凝素肽竞争抗体,磁性颗粒又由聚集态变成分散态, T_2 增加。该方法检测叶酸和流感血凝素肽,其检测限分别为3 nmol/L和50 nmol/L。研究还发现,当通过一个半透膜装置去除溶液中的小分子检测物时,磁性颗粒又会从分散态变成聚集态,通过这种方法可以对物质实施实时检测。根据这个原理,Karen^[37]等设计了一套可植入装置用于实时监测人绒毛膜促性腺激素(hCG)蛋白的浓度。

磁共振传感技术最初应用于蛋白、病毒、DNA序列、小分子的检测,Perez^[38]课题组将该项技术应用于致病菌的快速检测。将磁性纳米颗粒表面包被抗体,用于牛奶和血清中Mycobacterium avium spp. (MAP)的检测。该方法检测快速、灵敏度高,检出限为15.5 CFU/10 μ L,远低于传统的检测方法。该方法特异性强,加入金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、粪肠球菌等6种菌 T_2 不会发生显著的变化。Perez等人还发现,向分散态的磁性颗粒中加入少量的目标菌时,纳米颗粒迅速团聚, T_2 降低。而加入足量的目标菌时,游离存在的目标菌和磁性颗粒上抗体结合的目标菌产生竞争关系,使磁性颗粒由聚集状态变成相对分散的状态, T_2 增加,所以磁弛豫开关技术适合微量目标物的检测。该检测方法的检测灵敏度与磁性颗粒的聚集状态

和磁矩相关。Zhao^[16]等为了提高检测的灵敏度,用多克隆抗体修饰磁性纳米颗粒,检测奶粉中的阪崎肠杆菌(*Cronobacter sakazakii*)。加入目标菌后,多克隆抗体修饰的磁性纳米颗粒能识别阪崎肠杆菌上不同的抗原,导致更多的磁性颗粒聚集在微生物表面,聚集程度增加,检测限低至 1.1MPN,菌液浓度为 11~11000 MPN 时有很好的线性关系。Zhao^[39]等通过人工合成 Fe/Fe₃O₄ 纳米粒子,Fe/Fe₃O₄ 纳米粒子与普通的纳米粒子相比,拥有更大的磁矩^[40],磁性颗粒聚集时对水质子横向弛豫时间的影响更大,从而提高检测灵敏度。作者将单增李斯特菌的抗体修饰到 Fe/Fe₃O₄ 纳米粒子上用于检测单增李斯特菌,灵敏度显著提高,检测限为 3MPN^[39]。磁共振传感技术与微生物检测中广泛应用的酶联免疫吸附测定(Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay, ELISA)技术相比也有明显的优势。Wang^[41]等将纳米粒子用肠沙门氏菌的抗体修饰,用于检测肠沙门氏菌,同时与 ELISA 技术相比较。研究表明,该方法在菌液浓度为 5×10³~5×10⁵ CFU/mL 时有很好的线性关系,检测限为 10³ CFU/mL,而 ELISA 的检测限为 2×10⁴ CFU/mL,磁弛豫开关检测技术比 ELISA 方法的检测限低 20 倍,同时该方法检测速度更快,仅需 20 min,而 ELISA 需要 2~4 h。

3.2.2 黏附素(凝集素)-受体(糖类)

凝集素是指非免疫来源的糖结合蛋白或糖蛋白,能特异性与专一的糖基结合,具有使细胞凝集或糖类复合物沉淀的特点。一种凝集素具有对某一特异性糖基专一性结合的能力,如伴刀豆蛋白 A 与 α-D-吡喃糖基甘露糖(α-D-Mannopyranosy)结合;麦芽素与 N-乙酰葡萄糖胺(N-acetyl glucosamine)结合。利用凝集素与受体结合的性质,将凝集素或糖类修饰到磁性纳米粒子上,制备成传感器探针,用于目标物的检测^[42]。Kong 研究组^[43]等建立了酸性糖蛋白(A1-acid Glycoprotein, AGP)的 MRS 检测方法,该研究克服了 MRS 检测方法中因磁性颗粒和分析物比例不合适而引起的前区效应(Prozone effect),避免检测物直接和磁性颗粒反应,从而保证 MRS 方法的准确性。该方法的检测限可达 0.66 nmol/L,低于人体酸性糖蛋白 AGP 的正常水平。凝集素与碳水化合物结合的速率与凝集素结合位点结构、数目和空间排布相关,结合 MRS 技术可以用于凝集素种类的鉴定。Kulkarni^[44]等用 α-甘露糖苷修饰磁性微米颗粒,用于鉴别伴刀豆蛋白 A 和雪花凝集素(GNL)。雪花凝集素 A 与 α-甘露糖苷有 12 个结合位点,而伴刀豆蛋白 A 只有 4 个结合位点,加入雪花凝集素后磁性颗粒聚沉的速率明显大于加入伴刀豆蛋白 A。

3.2.3 DNA 互补序列

磁弛豫现象是 Weissleder 课题组通过 DNA 序列互补配对,引起磁珠聚集而发现的。该课题组^[22]通过共价修饰将两条有 12 个碱基的寡聚核苷酸修饰到纳米磁珠上,加入与之互补有 24 个碱基的寡聚核苷酸,发现纳米磁珠聚沉,同时引起水质子横向弛豫时间 T₂ 降低。纳米磁珠修饰寡聚核苷酸,通过碱基互补配对而引起 T₂ 变化,可以用于检测目标物的特定核苷酸序列,从而对目标物质进行检测。Xu^[45]等利用修饰的纳米材料为探针,结合磁共振成像(MRI)技术对重金属离子 Pb²⁺ 进行检测。作者将两条有 12 个碱基的寡聚核苷酸修饰到羧基化磁性纳米颗粒上,加入含有互补序列的脱氧核酶,纳米粒子聚集。铅离子作为脱氧核酶的辅酶因子,当铅离子存在时,酶的活性被激活, DNA 片段被切割,纳米粒子变成分散态。该方法的检测速度快,检测限为 0.05 ng/mL。MRS 技术检测速度快,结合配套的设备可以用于物质的即时检测。Liong^[17]等设计了一个检测系统,先提取结核分枝杆菌的 DNA 片段,通过 PCR 扩增目的序列,与目标 DNA 序列互补的寡核苷酸修饰的微米和纳米磁性颗粒目标 DNA 结合,引起 T₂ 变化。该方法检测时间短,只需 2.5 h,检测限低至 10³ CFU/mL。基于碱基互补配对而引起磁性颗粒聚沉,还可以用于检测特定的 PCR 产物。Alcantara^[46]等用 DNA 序列修饰磁性纳米颗粒,根据 T₂ 的变化检测特定的 PCR 产物,同时结合荧光分析。结果表明,该方法特异性好,检测限为 0.02 fmol/L,比常规荧光低。

3.2.4 配位化合物

有些物质能特异性和重金属离子形成配位化合物,如 β-胸腺嘧啶核苷能特异性和 Hg²⁺ 形成配位化合物^[47]。根据这种特性,将该种材料修饰到纳米粒子表面,利用磁共振检测技术就能对重金属离子进行检测。Yang^[48]等人将 β-胸腺嘧啶核苷修饰到纳米粒子上,加入 Hg²⁺,横向弛豫时间 T₂ 的变化。作者通过激光粒度分析仪和原子力显微镜阐述这一现象的原因,结果表明,加入 Hg²⁺ 后,纳米粒子团聚,粒径平均粒径由 114 nm 增加到 213 nm。同时研究还发现该方法的特异性好,加入其它的干扰离子,如 Cu²⁺、Ni²⁺、Ca²⁺、Mg²⁺、Na⁺、K⁺、Zn²⁺、Pb²⁺,则不会显著引起 T₂ 的变化。这一发现,为重金属离子的检测开辟了一个新的方向。Zhang^[49]等人利用 1-[2-氧代-2-(3,4-二羟基苯基)乙基]-1,2,3-三唑-4-甲酸乙酯(ETC)能与 Cd²⁺ 特异性结合的特点,通过共价修饰将 ETC 修饰到 Zn、Mn 掺杂的 Fe₃O₄ 纳米粒子表面,用于检测细胞中 Cd²⁺ 的浓度。结果表明该方法的特异性好,灵敏度高,检测

限低至 3.5 nmol/L。Zhang^[50]等人合成 Au-Fe₃O₄ 纳米粒子,对纳米粒子修饰 ETC,同时利用 Au 的光学特性和 Fe₃O₄ 的弛豫特性对 Cd²⁺ 进行快速检测。研究表明,利用 Au 的光学特性,Cd²⁺ 的检测限为 3.20 μmol/L,这比美国环境保护署(EPA)的标准要高,但该方法检测速度快。利用 Fe₃O₄ 的弛豫特性,Cd²⁺ 的浓度在 110 μmol/L 以下有很好的线性关系,检测限为 2.64 μmol/L。

3.2.5 亲和素/链霉亲和素-生物素

亲和素是一种由 4 个相同亚基组成的碱性糖蛋白,链霉亲和素是四聚体蛋白。一分子亲和素/链霉亲和素可以高度特异性地与四分子生物素结合,两者之间的亲和力极为强烈,亲和常数(K)为 10¹⁵ mol/L,比抗原与抗体之间的亲和力(K=10⁵~10¹¹ mol/L)至少高一万倍^[51]。Perez^[12]将亲和素-生物素特异性结合的特点与 MRS 技术结合起来,用于酶的活性分析。作者将生物素化的 DVED 肽段和亲和素分别修饰到不同的磁性纳米颗粒上,将这两种磁性颗粒混合,基于亲和素-生物素的特异性结合,磁性颗粒聚集,此时加入能催化 DVED 肽段的酶,在酶的作用下,DVED 肽段被分解,引起纳米粒子由聚集态变成分散态,导致横向弛豫时间 T₂ 增加。基于这个特点,可以用于酶的活性分析。Zhao^[52]等人将胰蛋白酶能特异性识别的肽段生物素化,磁性纳米颗粒用亲和素修饰。利用亲和素-生物素特异性结合的特点,分析胰蛋白酶的活性,同时用高效液相色谱法(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)测定底物的水解程度,作为参照。研究表明,T₂ 的变化与底物的水解程度相关。类似的原理,还可以用于肾素、基质金属蛋白酶 2(MMP-2)活性的分析。基于亲和素/链霉亲和素特异性结合的特点,也可以用于物质的快速检测。Chen^[53]等人基于链霉亲和素-生物素系统检测牛奶中的卡那霉素(KM),一分子链霉亲和素能和四分子生物素化连接抗体的磁性颗粒结合,即一分子链霉亲和素能和 4 个磁性纳米颗粒间接连接,增强了纳米磁性颗粒的聚集程度。研究表明,KM 的线性检测范围为 1.5~25.2 ng/mL,检测限为 0.1 ng/mL。且检测时间短,仅需 45 min,显著低于酶联免疫法的检测时间(6~8 h)。

3.2.6 其它结合方式

一些抗生素修饰到磁性颗粒上,加入其目标物,也能引起磁性颗粒聚集。如万古霉素,一种糖肽类抗生素,它可以与许多革兰氏阳性菌形成紧密的连接,其机制是通过细胞壁上的端肽 D-Ala-D-Ala 的氢键与万古霉素联接^[54]。Lee^[55]等人将万古霉素修饰到磁性

纳米颗粒上,结合芯片技术和 MRS 技术,用于检测金黄色葡萄球菌。研究表明,加入金黄色葡萄球菌后,纳米粒子团聚,T₂ 有显著性的变化,T₂ 的变化与金黄色葡萄球菌的浓度有很好的线性关系。该检测系统所需样品量少(5~10 μL),检测速度快(<15 min),可以用于微生物的快速筛选。

4 展望

磁共振传感技术因具有高选择性、高灵敏度以及能在不透明、浑浊的介质中能够实现对生物分子的检测等特点,并且磁性纳米颗粒表面能修饰不同的靶向物质,使得磁弛豫开关技术在生物检测方面得到了广泛的应用,若同时结合核磁共振成像(MRI)技术,还能对物质进行高通量检测。然而,磁弛豫开关技术在生物快速检测中,仍存在问题值得研究:(1)可植入小型磁共振检测传感器的制备:我们通过对磁性纳米粒子进行功能化修饰,用来标记待检测生物分子,可作为影响磁共振信号变化的磁共振对比剂。然而这种传感器目前受检测传感时间的持续性、磁性颗粒、生物分子的不可逆聚集以及其它生物分子的污染等方面的限制,还需对其做进一步改进。(2)不同种类样品的高通量筛选:磁弛豫开关检测技术结合 96 孔板/芯片和 MRI 技术,可以一次检测数百个样品。然而目前受磁性纳米颗粒修饰材料的限制,一次无法完成多样品的检测,因此待测物多样且快速的检测可作为磁弛豫开关检测技术今后发展的一个重要方向。

(3)仪器成本:磁共振成像(MRI)仪因价格昂贵,难以广泛投入到实际应用中;而台式核磁共振仪价格相对便宜,但无法对样品进行平行测定。因此为解决以上问题,核磁共振仪以后的发展方向需要朝着小型化发展,同时也需要结合其他技术,如芯片技术,使之能够实现高通量测定。

参考文献

- [1] Angelakeris M. Magnetic nanoparticles: A multifunctional vehicle for modern theranostics [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2017, 1861(6): 1642-1651
- [2] Hajba L, Guttman A. The use of magnetic nanoparticles in cancer theranostics: Toward handheld diagnostic devices [J]. *Biotechnology Advances*, 2016, 34(4): 354-361
- [3] Angel Rios, Zougagh M. Recent advances in magnetic nanomaterials for improving analytical processes [J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2016, 84: 72-83
- [4] 李云霞. 纳米磁珠对单增李斯特菌低场磁共振检测的影响研究[D]. 上海: 上海师范大学, 2016

- LI Yun-xia. Effect of nano-magnetic beads on low field MRI detection of *Listeria monocytogenes* [D]. Shanghai: Shanghai Normal University, 2016
- [5] Weissleder R, Pittet M J. Imaging in the era of molecular oncology [J]. *Nature*, 2008, 452(7187): 580-589
- [6] Tamanaha C, Mulvaney S, Rife J, et al. Magnetic labeling, detection, and system integration [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2009, 24(1): 1-13
- [7] Osterfeld S J, Yu H, Gaster R S, et al. Multiplex protein assays based on real-time magnetic nanotag sensing [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(52): 20637-20640
- [8] Wang S X, Bae S Y, Li G, et al. Towards a magnetic microarray for sensitive diagnostics [J]. *Journal of Magnetism & Magnetic Materials*, 2005, 293(1): 731-736
- [9] Chemla Y R, Grossman H L, Poon Y, et al. Ultrasensitive magnetic biosensor for homogeneous immunoassay [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(26): 14268-14272
- [10] Khaniabadi P M, Shahbazighrouei D, Jaafar M S, et al. Magnetic iron oxide nanoparticles as T2 MR imaging contrast agent for detection of breast cancer (MCF-7) cell [J]. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 2017, 9(4): 181-188
- [11] Keshtkar M, Shahbazighrouei D, Khoshfetrat S M, et al. Aptamer-conjugated magnetic nanoparticles as targeted magnetic resonance imaging contrast agent for breast cancer [J]. *Journal of Medical Signals & Sensors*, 2016, 6(4): 243-247
- [12] Perez J M, Josephson L, O'Loughlin T, et al. Magnetic relaxation switches capable of sensing molecular interactions [J]. *Nature Biotechnology*, 2002, 20(8): 816-820
- [13] Perez J M, Grimm J, Josephson L, et al. Integrated nanosensors to determine levels and functional activity of human telomerase [J]. *Neoplasia*, 2008, 10(10): 1066-1072
- [14] Colombo M, Ronchi S, Monti D, et al. Femtomolar detection of autoantibodies by magnetic relaxation nanosensors [J]. *Analytical Biochemistry*, 2009, 392(1): 96-102
- [15] Liang G, Cai S, Zhang P, et al. Magnetic relaxation switch and colorimetric detection of thrombin using aptamer-functionalized gold-coated iron oxide nanoparticles [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2011, 689(2): 243-249
- [16] Zhao Y, Yao Y, Xiao M, et al. Rapid detection of *Cronobacter sakazakii* in dairy food by biofunctionalized magnetic nanoparticle based on nuclear magnetic resonance [J]. *Food Control*, 2013, 34(2): 436-443
- [17] Liong M, Hoang A N, Chung J, et al. Magnetic barcode assay for genetic detection of pathogens [J]. *Nature Communications*, 2013, 4(2): 1752
- [18] Atanasijevic T, Shusteff M, Fam P, et al. Calcium-sensitive MRI contrast agents based on superparamagnetic iron oxide nanoparticles and calmodulin [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(40): 14707-14712
- [19] Sobczakupiec A, Venkate J, Alhathal A, et al. Magnetic nanomaterials and sensors for biological detection [J]. *Nanomedicine Nanotechnology Biology & Medicine*, 2016, 12(8): 2459-2473
- [20] Alcantara D, Lopez S, Garcia-Martin M L, et al. Iron oxide nanoparticles as magnetic relaxation switching (MRSw) sensors: Current applications in nanomedicine [J]. *Nanomedicine Nanotechnology Biology & Medicine*, 2016, 12(5): 1253-1262
- [21] Haun J B, Yoon T J, Lee H, et al. Magnetic nanoparticle biosensors [J]. *Wiley Interdisciplinary Reviews Nanomedicine & Nanobiotechnology*, 2010, 2(3): 291-304
- [22] Josephson L, Perez J M, Weissleder R. Magnetic nanosensors for the detection of oligonucleotide sequences [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2010, 40(17): 3204-3206
- [23] Chen Y, Zou M, Wang D N, et al. An immunosensor based on magnetic relaxation switch and polystyrene microparticle-induced immune multivalency enrichment system for the detection of *Pantoea stewartii* subsp. *Stewartii* [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2013, 43(1): 6-11
- [24] Xu Z, Kuang H, Yan W, et al. Facile and rapid magnetic relaxation switch immunosensor for endocrine-disrupting chemicals [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2012, 32(1): 183-187
- [25] Koh I, Hong R, Weissleder R, et al. Sensitive NMR sensors detect antibodies to influenza [J]. *Angewandte Chemie*, 2010, 120(22): 4187-4189
- [26] Koh I, Hong R, Weissleder R, et al. Nanoparticle-target interactions parallel antibody-protein interactions [J]. *Analytical Chemistry*, 2009, 81(9): 3618-3622
- [27] Hong R, Cima M J, Weissleder R, et al. Magnetic microparticle aggregation for viscosity determination by MR [J]. *Magnetic Resonance in Medicine*, 2010, 59(3): 515-520
- [28] Chen Y W, Hsieh C J, Lin C M, et al. NMR relaxation study of water dynamics in superparamagnetic iron-oxide-loaded

- vesicles [J]. Journal of Chemical Physics, 2013, 138(6): 12387
- [29] Poselt E, Kloust H, Tromsdorf U, et al. Relaxivity optimization of a PEGylated iron-oxide-based negative magnetic resonance contrast agent for T(2)-weighted spin-echo imaging [J]. ACS Nano, 2012, 6(2): 1619-1624
- [30] Min C, Shao H, Liang M, et al. Mechanism of magnetic relaxation switching sensing [J]. ACS Nano, 2012, 6(8): 6821-6828
- [31] Tan W, Wang K, He X, et al. Bionanotechnology based on silica nanoparticles [J]. Medicinal Research Reviews, 2010, 24(5): 621-638
- [32] Zhao X, Hilliard L R, Mechery S J, et al. A rapid bioassay for single bacterial cell quantitation using bioconjugated nanoparticles [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(42): 15027-15032
- [33] 申静,孟雪,那美玲,等.基于NMR纳米探针的生物传感器用于快速检测沙门氏菌[J].食品工业科技,2016,37(5):187-190
SHEN Jing, MENG Xue, NA Mei-ling, et al. Biosensor based on NMR nanoprobe for rapid detection of *Salmonella* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37(5): 187-190
- [34] Kim G Y, Josephson L, Langer R, et al. Magnetic relaxation switch detection of human chorionic gonadotrophin [J]. Bioconjugate Chemistry, 2007, 18(6): 2024-2028
- [35] Cai S, Liang G, Zhang P, et al. A miniature chip for protein detection based on magnetic relaxation switches [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2011, 26(5): 2258-2263
- [36] Sun E Y, Weissleder R, Josephson L. Continuous analyte sensing with magnetic nanoswitches [J]. Small, 2010, 2(10): 1144-1147.
- [37] Daniel K D, Kim G Y, Vassiliou C C, et al. Implantable diagnostic device for cancer monitoring [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2009, 24(11): 3252-3257
- [38] Kaittanis C, Naser S A, Perez J M. One-step, nanoparticle-mediated bacterial detection with magnetic relaxation [J]. Nano Letters, 2007, 7(2): 380-383
- [39] Zhao Y, Li Y, Jiang K, et al. Rapid detection of *Listeria monocytogenes*, in food by biofunctionalized magnetic nanoparticle based on nuclear magnetic resonance [J]. Food Control, 2017, 71: 110-116
- [40] Castro C M, Ghazani A A, Chung J, et al. Miniaturized nuclear magnetic resonance platform for detection and profiling of circulating tumor cells [J]. Lab on A Chip, 2013, 14(1): 14-23
- [41] Wang S, Zhang Y, An W, et al. Magnetic relaxation switch immunosensor for the rapid detection of the foodborne pathogen *Salmonella enterica*, in milk samples [J]. Food Control, 2015, 55: 43-48
- [42] Hatch D M, Dr A A W, Dr R R K, et al. Biotinylated bi-and tetra-antennary glycoconjugates for *Escherichia coli* detection [J]. ChemBioChem, 2010, 9(15): 2433-2442
- [43] Cai S, Liang G, Zhang P, et al. Rational strategy of magnetic relaxation switches for glycoprotein sensing [J]. Analyst, 2010, 136(1): 201-204
- [44] Kulkarni A A, Weiss A A, Iyer S S, et al. Detection of carbohydrate binding proteins using magnetic relaxation switches [J]. Analytical Chemistry, 2010, 82(17): 7430-7435
- [45] Xu L, Yin H, Ma W, et al. MRI biosensor for lead detection based on the DNzyme-induced catalytic reaction [J]. Journal of Physical Chemistry B, 2013, 117(46): 14367-14371
- [46] Alcantara D, Guo Y, Yuan H, et al. Fluorochrome-functionalized magnetic nanoparticles for high-sensitivity monitoring of the polymerase chain reaction by magnetic resonance [J]. Angewandte Chemie International Edition, 2012, 51(28): 6904-6907
- [47] Lee J S, Han M S, Mirkin C A. Colorimetric detection of mercuric ion (Hg^{2+}) in aqueous media using DNA-functionalized gold nanoparticles [J]. Angewandte Chemie, 2010, 119(22): 4171-4174
- [48] Yang H, Tian Z, Wang J, et al. A magnetic resonance imaging nanosensor for Hg (II) based on thymidine-functionalized supermagnetic iron oxide nanoparticles [J]. Sensors & Actuators B Chemical, 2012, 161(1): 429-433
- [49] Zhang Y, Shen J, Yang H, et al. A highly selective magnetic sensor for Cd^{2+} , in living cells with (Zn, Mn)-doped iron oxide nanoparticles [J]. Sensors & Actuators B Chemical, 2015, 207: 887-892
- [50] Zhang Y, Zhao Y, Yang Y, et al. A bifunctional sensor based on Au- Fe_3O_4 nanoparticle for the detection of Cd^{2+} [J]. Sensors & Actuators B Chemical, 2015, 220: 622-626
- [51] Hyre D E, Le T I, Merritt E A, et al. Cooperative hydrogen bond interactions in the streptavidin-biotin system [J]. Protein Science, 2010, 15(3): 459-467
- [52] Zhao M, Josephson L, Tang Y, et al. Magnetic sensors for protease assays [J]. Angewandte Chemie, 2003, 42(12): 1375-1378

- [53] Chen Y P, Zou M, Qi C, et al. Immunosensor based on magnetic relaxation switch and biotin-streptavidin system for the detection of Kanamycin in milk [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2013, 39(1): 112-117
- [54] Zhu M, Liu W, Liu H, et al. Construction of Fe₃O₄/vancomycin/ PEG magnetic nanocarrier for highly efficient pathogen enrichment and gene sensing [J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2015, 7(23): 12873-12881
- [55] Lee H, Sun E, Ham D, et al. Chip-NMR biosensor for detection and molecular analysis of cells [J]. Nature Medicine, 2008, 14(8): 869-874

现代食品科技