

生物标志物检测方法的研究进展

刘睿轩, 朱全红* (南方医科大学中医药学院, 广州 510515)

摘要: 生物标志物是目前临床上用于疾病的早期诊断、分类、预后评价的重要指标。近年来, 生物标志物检测方法迅猛发展, 在抗原抗体结合原理检测方法的基础上, 结合光、电等信号变化, 使检测方法的特异性及灵敏度大大提高; 同时在识别元件方面发展了分子印迹、核酸适配体、单域抗体等方法, 弥补了传统抗体稳定性、重复性差等不足。本文对目前的生物标志物检测方法做一综述, 并对其未来的发展进行了展望。

关键词: 生物标志物; 检测方法; 早期诊断

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2020)03-0378-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.03.025

引用本文: 刘睿轩, 朱全红. 生物标志物检测方法的研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(3): 378-384.

Research Progress of New Methods for Biomarker Detection

LIU Ruixuan, ZHU Quanhong* (College of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

ABSTRACT: Biomarker is an important indicator for clinical diagnosis, classification, and prognosis of diseases. In recent years, biomarker detection methods have been developed rapidly. On the basis of the antigen-antibody binding principle, the traditional detection methods have been improved combined with the changes of light and electricity and the specificity and sensitivity have been increased satisfactorily. In the field of recognition element, molecular imprinting, aptamer and single-domain antibodies have been developed for improving the stability and reproducibility of detection methods. This article will review the current biomarker detection methods and prospects for their future development.

KEYWORDS: biomarker; detection methods; early diagnosis

生物标志物是指可以标记系统、器官、组织、细胞及亚细胞结构或功能改变或可能发生改变的生化指标, 覆盖很广泛的生化实体, 如核酸、蛋白质、酶、糖类、活性分子以及体内发现的肿瘤细胞等, 常用于疾病诊断及分类, 判断疾病分期、发展及严重程度, 或者用来评价临床新药或新疗法的安全性及有效性, 以及预测个体发病风险和高危人群临床筛查等^[1]。生物标志物具有重要的临床意义, 但由于存在于体液中, 基质复杂, 背景干扰大, 且含量低, 其检测往往比较困难。目前生物标志物的检测主要基于两大要素: 识别元件和信号放大。识别元件主要基于抗原抗体结合的免疫分析原理, 在传统天然抗体的基础上, 发展了分子印迹聚合物(molecularly imprinted polymers, MIPs)、核酸适配体、单域抗体等识别元件, 表现出与天然抗体相当的高亲和力和选择性, 且具有性能稳定的优势。放大信号通常是利用具有光电

性质的物质, 例如量子点、纳米线、碳纳米管等纳米材料制备光、电传感器, 或将某些具备特殊性质的材料及试剂与识别元件结合, 在识别分析物后对产生的信号进行增益, 根据引起的光、电、化学等变化进行检测, 提高生物标志物检测的灵敏度、可行性和易用性。本文根据识别元件的原理对近年来生物标志物的检测方法及相关研究进展进行综述。

1 识别元件

1.1 传统抗体

抗原-抗体识别是目前生物标志物检测中最主要的识别方式, 生物标志物本身可作为抗原, 其对应的抗体作为识别元件, 利用抗原与抗体之间所发生的特异性结合实现生物标志物的检测。基于此原理的多种方法包括酶联免疫吸附法(ELISA)、放射免疫分析法及免疫胶体技术等。ELISA 法是将已知的抗原(抗体)吸附于固相载体

基金项目: 广东省科技计划(2016A010103016); 广州市科技计划(201607010148)

作者简介: 刘睿轩, 女, 硕士生 Tel: 13250770601 E-mail: tracy1994@smu.edu.cn *通信作者: 朱全红, 女, 博士, 教授 Tel: 13076878540 E-mail: zqh@smu.edu.cn

表面,加入抗体(抗原)与酶结合成的偶联物,通过加入酶底物的颜色反应来确定抗原抗体结合量。PÉREZ-RUIZ 等^[2]针对阿尔兹海默病(Alzheimer's disease, AD)生物标志物 Tau 蛋白脑脊液取材困难、使用受限的弊端,研制了一种血清中痕量 Tau 蛋白的数字化 ELISA 检测方法,即利用磁性粒子表面的抗体捕获单个 Tau 分子,将其分布到 2 mm×2 mm 微孔阵列中,通过计算显示具有酶活性的微孔数量来量化被捕获的 Tau 靶分子数,检测限达到 55±29 aM。放射免疫分析是一种通过高放射性示踪物标记抗原,通过观察抗原与抗体结合反应产物来定量微量物质的一种分析方法。Lim 等^[3]利用放射免疫分析法检测结肠腺瘤(colon adenoma, CA)患者、良性结肠病患者以及正常患者的细胞角蛋白片段 19 血清可溶性片段 CYFRA 21-1 水平,结果显示结肠腺瘤患者 CYFRA 21-1 水平显著高于其他 2 组,提示 CYFRA 21-1 可作为 CA 的疾病标志物。免疫胶体金技术是以胶体金作为示踪标志物应用于抗原-抗体的一种新型的免疫标记技术,可实现床旁检测,目前在临床中得到广泛的应用。Ma 等^[4]合成了 HIV-1 型标志物 p24 蛋白的单克隆抗体,并将其应用于胶体金免疫层析法中,该方法整体特异性达 98.03%。

1.2 MIPs

MIPs 是表面预留有目标分子孔穴的一种高分子材料,具有性能稳定、抗恶劣环境能力强、成本低、使用寿命长等优点,由于预留的孔穴在形状、大小、空间结构上能与目标分子完全匹配,因此在特异性识别目标分子方面表现出良好的性能。申晓雷^[5]在电极表面分别制备了肿瘤标志物甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)、人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, hCG)和前列腺特异抗原(prostate specific antigen, PSA)的 MIPs 膜,用于 AFP、hCG、PSA 的检测。该法对 3 种肿瘤标志物的检测限分别为 96, 0.035, 0.15 pg·mL⁻¹,从而实现了 3 种肿瘤标志物的高灵敏度和高选择性检测。Shumyantseva 等^[6]以邻苯二胺为单体在石墨电极表面通过电聚合合成了心脏疾病标志物肌红蛋白(Myo)的 MIPs,与多壁碳纳米管结合测定血液中 Myo 的浓度,灵敏度达 1.5×10⁻² A·nmol⁻¹。Sharma 等^[7]以制备了 MIPs 薄膜作为电化学传感器的识别单元,用以检测疾病

标志物新喋呤,具有高灵敏度和特异性,可区分新喋呤结构类似物,检测的线性范围为 0.15~2.5 mmol·L⁻¹,检测限为 22 μmol·L⁻¹。Rossetti 等^[8]利用 *N*-(2-氨基乙基)甲基丙烯酰胺盐酸盐(EAMA)作为功能单体,二乙烯基苯作为交联剂,以小细胞肺癌生物标志物胃泌素释放肽前体的特征性肽段 NLLGLIEAK 作为模板分子,合成 MIPs,应用于固相萃取柱,用于生物样本中胃泌素释放肽前体的检测,具有较强的富集能力,且易于洗脱,可用于生物标志物的绝对定量。为了区分 AD 的不同生物标志物 Aβ1-40 和 Aβ1-42,URRACA 等^[9]以 2 种标志物相应的 *N*-乙酰基-C 端六肽为模板,从 MIPs 库中筛选对其分别有特异性吸附的 MIPs,并用其制备固相萃取柱,用于血清样品中不同生物标志物的分离富集及检测,结果显示以 Aβ1-42 相应肽段筛选得到的 MIPs 对 2 种不同标志物的区分程度较好。

1.3 核酸适配体

核酸适配体是一段 DNA、RNA 序列、核酸类似物或肽,通常是利用体外筛选技术——指数富集的配体系统进化技术(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX),从核酸分子文库中得到的对目标物具有特异性结合能力的寡核苷酸片段^[10],与传统的抗体相比,核酸适配体具有性质稳定、易合成、易标记、特异性和亲和力强,作用靶分子广泛,进行筛选所需周期短,降解速度慢等特点,可将其作为识别元件检测分析物。王沛^[11]以 AD 的标志物 Aβ42 为靶标进行核酸适配体的筛选,并用于 AD 的检测,得到了亲和力高、特异性好的核酸适配体 Aβ7-92、Aβ9-103,二者与 Aβ42 结合的 *K_d* 值分别为 8.7, 91.6 nmol·L⁻¹。Grabowska 等^[12]筛选了早期心衰标志物 B 型钠尿肽-32 及肌钙蛋白 I 的核酸适配体,将其与聚乙烯亚胺/石墨烯薄膜改性的丝网印刷电极共价链接,用于血液中 2 种生物标志物的灵敏检测,对 2 种生物标志物的线性响应分别为 1~1000 000 pg·mL⁻¹ 及 1~10 000 000 pg·mL⁻¹。Pan 等^[13]采用 SELEX 技术分别筛选了 3 种胃癌标志物癌胚抗原(carcino-embryonic antigen, CEA)、糖抗原 50(CA50)和糖抗原 27-4(CA72-4)的 RNA 适配体文库,结合高通量测序,鉴定了 6 种特异性靶向 3 种胃肠癌标志物的高亲和力适配体,有助于进一

步开发对胃肠癌具有良好的灵敏度和特异性的标准化临床诊断方法。Amouzadeh 等^[14]制备了一种基于干涉反射光谱的核酸适配体传感器,用于检测 AD 生物标志物 A β 寡聚体。将核酸适配体固定多孔阳极纳米氧化铝上,插入亚甲蓝(methylene blue, MB)光学探针,形成 MB/G-(鸟嘌呤)四联体,当结合 A β 寡聚体时,MB/G-四联体解聚,此时反射到电荷耦合检测器的光强度显著增高,因此可通过光强度变化对 A β 寡聚体进行定量,A β 寡聚体含量在 0.5~50.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好。Chai 等^[15]开发了一种基于核酸适配体的双信号放大电化学分析方法,用以检测癌症标志物人表皮因子生长受体 2(human epidermal factor growth receptor 2, HER2),在金电极上固定特异性肽段结合分析物中的 HER2,再加入固定有 HER2 核酸适配体及磷酸根的 MnO_2 纳米片,适配体与金电极上的 HER2 结合,形成夹心结构,最后加入钼酸盐与纳米片上的磷酸根反应,生成具氧化还原活性的磷钼酸盐,激发电化学电流,从而实现检测目的,该方法检测限可达 0.05 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

1.4 单域抗体

单域抗体是指利用基因工程方法从软骨鱼和骆驼科动物中克隆得到的一种仅有重链的抗体,此类抗体的抗原结合位点仅由单一结构域组成,体积为传统抗体的 1/10,也称为纳米抗体,具有分子小、稳定性高、可溶性好、易表达、抗原识别能力强等特点,可将其作为识别元件应用于生物标志物检测方法中^[16-17]。Kavousipour 等^[18]利用噬菌体展示技术从合成文库中分离得到对于癌症干细胞生物标志物透明质酸 CD44 受体的单域抗体,此单域抗体能够成功识别并结合表达 CD44 表面抗原的细胞,可用于诊断恶性肿瘤。FARAJI 等^[19]同样利用噬菌体展示技术筛选了一种单域抗体 To15,用于检测 B 细胞恶性肿瘤,该单域抗体对 CD22 阳性细胞裂解物中的 CD22 抗原及细胞表面的 CD22 抗原具有高特异性,可用于诊断 B 细胞恶性肿瘤的发生。WANG 等^[20]筛选得到了针对非小细胞肺癌生物标志物 CEA 的单域抗体,并利用铈 99m 及荧光标记考察其靶向性,结果显示该单域抗体对于 CEA 阳性的 H460 细胞具有高特异性及靶向性,证实此单域抗体可作为 CEA 阳性肿瘤,如非小细胞肺癌的分子探针。REN 等^[21]筛选

分离得到 AD 生物标志物载脂蛋白(apolipoprotein E, ApoE)的单域抗体 Nbs 与葡萄糖氧化酶 GOD 以及金-二氧化钛纳米粒缀合,固定在戊二醛 3-氨基丙基三甲氧基硅烷基质上制备检测传感器,当单域抗体 Nbs 识别捕捉 ApoE 后,在传感器中加入葡萄糖,葡萄糖与 GOD 反应生成的 H_2O_2 可将砖红色的戊二醛 3-氨基丙基三甲氧基硅烷氧化褪色,通过比色法可确定 ApoE 含量,其检出限为 0.42 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。该法操作简便、检测快速,可实现 ApoE 的床旁检测。

2 信号放大

2.1 表面增强拉曼光谱(surface-enhanced raman scattering, SERS)

拉曼是一种光散射技术,当激光光源的入射光被靶分子散射时,极小一部分的散射光的波长与入射光不同,引起信号非常弱的拉曼散射。当靶分子非常靠近或吸附在具有纳米结构表面时,其拉曼信号显著增强,由此产生的光谱称作 SERS,近年来被用于生物标志物的检测分析。通常利用纳米粒子合成 SERS 活性基底,抗体附着于活性基底上,对生物标志物进行识别与捕获,产生的拉曼散射作为结合信号的放大途径,从而实现高灵敏度检测的目的。SERS 光谱谱带窄、分辨率高、稳定性好,且样品无需预处理,不受溶剂干扰,具有快速、灵敏、选择性高等特点。ZHENG 等^[22]设计了一个基于 SERS 的微流体生物传感器,用于检测乳腺癌的生物标志物 CEA、CA153、CA125。将银纳米粒子固定在微流控通道上,形成具有 SERS 活性的基底;抗体附着在 SERS 基底的不同区域,用以捕获目标生物标志物。该传感器对 CEA、CA153、CA125 的检测限分别为 1 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、0.01, 0.01 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。YANG 等^[23]在功能化的玻璃表面自组装 Au 纳米颗粒,用尿素修饰 Au 阵列合成了 SERS 基底,用于测定鼻咽癌及阻塞性脂蛋白生物标志物亚硝酸盐的浓度。在酸性介质中,亚硝酸盐与尿素发生重氮化反应,使尿素在 1 003 cm^{-1} 处的 SERS 带强度减弱,根据 SERS 带的强度变化测定亚硝酸盐的含量,该方法亚硝酸盐在 20~120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 间呈良好的线性关系。ZHOU 等^[24]将检测抗体固定在修饰的二氧化硅纳米粒表面,制备了纳米硅免疫探针,再将其固定在电镀 SiC 砂纸表面的银膜上,构建了 SiC@Ag

SERS 活性免疫底物, 用于检测人血清中的 PSA、AFP 和 CA19-9 等肿瘤标志物。SiC@Ag SERS 活性免疫底物表现出优异的 SERS 性能, 对于 3 种抗原的检测限分别低至 1.79, 0.46 $\text{fg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $1.3\times 10^{-3}\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.2 表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)

SPR 是一种物理光现象。光在玻璃界面处发生全内反射时的消逝波, 可以引发金属表面的自由电子产生表面等离子体, 当入射角或波长为某一适当值时, 表面等离子体与消逝波的频率和波数相等, 二者将发生共振, 入射光被吸收而使反射光能量急剧下降, 在反射光谱上出现共振峰(即反射强度最低值), 此时的入射角为 SPR 角。SPR 角随金属表面折射率变化而变化, 而折射率的变化又与金属表面结合的分子质量成正比, 因此 SPR 常用于实时跟踪生物分子间的相互作用, 并对结合的物质进行定量检测。检测时一般将抗体固定在传感器表面, 当靶分子溶液流经传感器表面时, 会引起传感器表面质量增加, 导致折射率发生变化, 分子间的相互作用即可被量化。SPR 无需标记样品, 可实现实时连续监测, 检测方便快捷、灵敏度高、重现性好、芯片可再生且检测通量高。衣馨瑶等^[25]将 AD 的生物标志物 A β 1-42 及其结合蛋白 TTR 的抗体分别固定在 SPR 的双通道上, 使待测溶液连续流过两通道, 通过记录 SPR 角度变化获得待测溶液与抗体结合的动力学过程, 并同时实现 TTR 和 A β 1-42 的定量测定。彭贞^[26]采用纳米金放大 SPR 双通道的信号, 检测游离前列腺特异性抗原 f-PSA 和总前列腺特异性抗原 t-PSA 的线性范围分别为 0.05~0.4 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、1~20 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 满足了血清中痕量 f-PSA 和 t-PSA 的检测, 临床上可用于诊断前列腺癌、区分灰区(检测阳性可疑)前列腺癌与前列腺增生。WANG 等^[27]开发了一种多通道 SPR 生物传感器, 可同时准确检测 AFP、CEA 和 CYFRA 21-1。该传感器通过金纳米粒-抗体缀合物放大策略, 将信号放大 50 倍, 检测限低至 0.1 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 大大提高了检测的灵敏度、特异性和选择性。VERGARA 等^[28]采用一种无标记的 SPR 方法, 利用蛋白 A 将抗 E-钙粘蛋白抗体固定在 SPR 传感器化学修饰后的基质上, 准确检测了血清中可溶的肿瘤标志物 E-钙粘蛋白, 临床血清

样本中 E-钙粘蛋白浓度为(2420 \pm 419.7) $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, 检测结果与 ELISA 法基本一致(2390 \pm 192.7) $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.3 化学发光免疫法(chemiluminescence immunoassay, CLIA)

CLIA 是一种将高灵敏度的化学发光技术与高特异性的免疫反应相结合的分析技术, 它是将化学发光物质例如吡啶酯类化合物或酶作为标记物, 直接标记在抗原或抗体上, 免疫反应结束后, 加入氧化剂或酶的发光底物, 使化学发光物质形成一个处于激发态的中间体, 会发射光子释放能量, 以回到稳定的基态, 可根据化学发光标记物与发光强度的关系, 计算出被测物的含量^[29]。CLIA 具有灵敏度高、检测范围宽、稳定、快速、操作简单、价格低廉、自动化程度高等优点。何继宏^[30]采用 CLIA 测定了 50 例原发性肝癌患者的 CA199、CA125、CEA、AFP、 γ -谷氨酰转肽酶等标志物, 发现这些指标与健康对照组相比均显著增高。HU 等^[31]开发了一种便携式一体化微流控化学发光免疫测定平台, 实现了临床上血清样品中 C 反应蛋白及睾酮的即时检测, 二者的检测限分别为 4.27, 0.45 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。该检测平台由微流控集成芯片和定量部分组成, 在芯片上同时构建顶部流体层、中间抗原抗体层及底部基底层, 检测时打开顶部流体层样品储液器, 流入中间抗原-抗体层进行识别, 底部基底层用于收集反应液进行处理, 定量仪器用于后续化学发光分析定量。该检测平台对于生物标志物的检测显示出良好的重现性和灵敏度。Jankowska 等^[32]收集了 491 例收缩期慢性心力衰竭患者的血样, 采用 CLIA 检测了血浆中 C-末端前内皮素-1(CT-proET-1)及 N-末端脑钠肽前体(NT-proBNP)的水平, 结果显示 CT-proET-1 作为一种新的预测因子, 可与 NT-proBNP 共同作为收缩期慢性心力衰竭的检测指标, 并可提供更详尽可靠的预后资料。

2.4 量子点荧光检测法

量子点是一种纳米级别的半导体, 可将电子锁定在一个非常微小的三维空间内, 光照射时电子会受激发跃迁到更高的能级, 回到低能级时会发射荧光。量子点具有荧光激发光谱宽、发射光谱窄、发射波长可调、光学稳定性好、寿命长、表面易于修饰和功能化以及生物相容性好等优点, 用量子点标记抗体, 作为免疫荧光探针, 可

放大免疫反应信号, 实现生物标志物的快速灵敏检测。郭利宁等^[33]开发了一种用于检测类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)的免疫荧光试纸条, 用 CdTe 量子点标记了 RA 疾病标志物环瓜氨酸多肽的抗体, 从而实现检测目的, 灵敏度为 97.5%, 特异性 95.8%。该法操作简单、快速, 可实现床旁检测, 具有良好的应用前景。Kim 等^[34]报告了一种检测脑外伤标志物 S100B 蛋白的磁珠-量子点夹心测定法, 将磁珠-抗体-量子点进行偶联, 通过抗体捕获 S100B 蛋白, 再经量子点进行光学检测, 可实现 S100B 蛋白的快速捕获、浓缩、磁选和洗涤, 检测灵敏度高、特异性好。Liu 等^[35]开发了一种基于磁珠的多重免疫测定芯片, 利用软微影技术将悬浮和平面微阵列形式结合在单层聚二甲基硅氧烷中, 悬浮形式是通过特异性抗体-抗原相互作用在磁珠和量子点探针之间, 形成靶蛋白夹心结构, 而平面阵列形式则通过在聚二甲基硅氧烷中制造一系列微孔来捕获单个微珠, 进而产生微珠阵列, 利用该芯片同时检测 3 种肺癌生物标志物 CEA、CYFRA21-1 和神经元特异性烯醇化酶的片段, 3 种标志物的检测限分别为 0.19, 0.97, 0.37 ng·mL⁻¹。

2.5 电化学分析法

电化学分析法是一种基于分析物在溶液中的电化学性质原理的痕量分析方法, 电化学分析法应用于生物标志物检测时, 通常将分析物组成一个化学电池, 电化学传感器与抗体组装偶联, 置于分析物溶液中。当待分析物与抗体结合时, 会进一步引起该化学电池的电位、电流、电导等物理量的变化, 从而实现放大信号的目的, 具有灵敏度高、准确度高、测量范围宽等特点。Lee 等^[36]在单聚苯胺纳米线的表面固定心梗标志物 Myo 的抗体, 当 Myo 结合到纳米线表面时, 则会引起纳米线电导的改变, 从而将生物信号转变为电信号。该传感器对 IgG、Myo 的检测限分别为 3, 1.4 ng·mL⁻¹, 而且响应时间短, 灵敏度高, 特异性好。张伊^[37]采用电还原法制备了石墨烯修饰的电极, 建立了一种高灵敏度及准确度的痕量萘酚异构体检测方法用于检测多环芳烃暴露的标志物 α 萘酚和 β 萘酚, 及一种快速灵敏的差分脉冲伏安原位富集方法用于检测多环芳烃暴露的标志物 1-羟基芘, 3 种物质的检测限分别为 0.84, 1.01,

0.43 nmol·L⁻¹。Li 等^[38]以银纳米粒或金纳米粒包被的碳纳米球为标记, 研制了一种用于检测 CEA 和 AFP 的多重电化学免疫传感器。该传感器以结构均匀、单分散性好的碳纳米球作为固定金银纳米粒、硫堇(Thi)和二抗(Ab2)的载体(CNSs@AgNPs 和 CNSs@Thi-AuNPs), 以还原氧化石墨烯/金纳米粒(rGO/Au NPs)复合材料作为传感底物组装待测蛋白的一抗(Ab1), 在靶蛋白存在下, 通过夹心免疫反应将 CNSs@AgNPs、CNSs@Thi-AuNPs 附着到复合材料表面, 利用差分脉冲伏安法进行检测, CEA 和 AFP 的检出限分别达到 2.8, 3.5 pg·mL⁻¹。

此外, 质谱法作为一种高灵敏、能够精确定量的分析方法, 与气相色谱、液相色谱、毛细管电泳等色谱方法联用, 用于生物标志物的分离、筛选及检测, 常结合蛋白组学、代谢组学等提供较全面的生物标志物相关信息^[39-42]。另外, 聚合酶链反应是目前被广泛使用的一种简单、敏感、高效、特异和快速的, 能在体外扩增 DNA 的技术, 具有高通量、特异性强、敏感性高等优势, 可用于循环肿瘤 DNA、miRNA 及外泌体等生物标志物的检测^[43-44]。

3 总结与展望

生物标志物作为疾病的指征性指标, 对于疾病的诊断具有重要意义, 因而操作简便、检测快速、灵敏度高、选择性及特异性高是生物标志物检测方法的发展方向。传统方法以抗体作为识别元件, 选择性及特异性均较高, 但具有操作复杂、检测时间长、效率低的缺点, 同时易受到背景基质等环境因素的影响, 进而影响检测灵敏度。一些基于新型抗体(如 MIPs、核酸适配体、单域抗体等)作为识别元件的检测方法, 稳定性好, 制备简便, 选择性与传统抗体具有可比性, 在生物标志物检测方面得到广泛应用。另外, 在识别元件的基础上, 以光、电等形式对检测信号进行表征及放大, 减少了其他因素干扰, 大幅度增加了检测灵敏度及重现性, 提高检测效率。

近年来, 即时床旁检测需求不断增加, 免疫胶体金技术是推动床旁检测技术逐渐发展成熟的重要技术手段。基于 CLIA 以及电化学分析法研发的全自动免疫分析系统, 实现了高特异性、高效、高自动化, 也逐渐应用于临床床旁检测。目前, 微流控芯片, 多靶标、高通量的芯片系统对于多

种目标分子之间相关性分析更加准确, 有利于临床多指标快速确证疾病, 而且生物样品消耗量小、成本低, 可实现多样本的高通量检测, 具有广阔的应用前景。

REFERENCES

- [1] LI A L, SONG J. Biomarkers classification and their application in clinical medicine [J]. *Chin J Pharm Toxicol*, 2015, 29(1): 7-13.
- [2] PÉREZ-RUIZ E, DECROP D, VEN K, et al. Digital ELISA for the quantification of attomolar concentrations of Alzheimer's disease biomarker protein Tau in biological samples [J]. *Anal Chim Acta*, 2018(1015): 74-81.
- [3] LIM D H, LEE J H, KIM J W. Feasibility of CYFRA 21-1 as a serum biomarker for the detection of colorectal adenoma and advanced colorectal adenoma in people over the age of 45 [J]. *J Clin Lab Anal*, 2017, 32(1): e22163. Doi: 10.1002/jcla.22163.
- [4] MA Y, NI C, DZAKAH E E, et al. Development of monoclonal antibodies against HIV-1 p24 protein and its application in colloidal gold immunochromatographic assay for HIV-1 detection [J]. *Biomed Res Int*, 2016(2016): 6743904. Doi: 10.1155/2016/6743904.
- [5] SHEN X L. Preparation and application of molecularly imprinted electrochemical sensors for three typical tumor markers [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2017.
- [6] SHUMYANTSEVA V V, BULKO T V, SIGOLAEVA L V, et al. Polymer matrices with molecular memory as affine adsorbents for the determination of myoglobin as a cardiac marker of acute myocardial infarction by voltammetry [J]. *J Anal Chem*, 2017, 72(4): 410-414.
- [7] SHARMA P S, WOINAROWICZ A, SOSNOWSKA M, et al. Potentiometric chemosensor for neopterin, a cancer biomarker, using an electrochemically synthesized molecularly imprinted polymer as the recognition unit [J]. *Biosens Bioelectron*, 2016(77): 565-572.
- [8] ROSSETTI C, ABDEL Q A, HALVORSEN T G, et al. Antibody-free biomarker determination: exploring molecularly imprinted polymers for pro-gastrin releasing peptide [J]. *Anal Chem*, 2014, 86(24): 12291-12298.
- [9] URRACA J L, AURELIANO C S A, SCHILLINGER E, et al. Polymeric complements to the Alzheimer's disease biomarker β -amyloid isoforms $A\beta$ 1-40 and $A\beta$ 1-42 for blood serum analysis under denaturing conditions [J]. *J Am Chem Soc*, 2011, 133(24): 9220-9223.
- [10] MAN Y, LV X F, ZHANG Y K, et al. Aptamers and their application in biomedicine [J]. *Space Med Med Eng*, 2013, 26(6): 485-490.
- [11] WANG P. *In vitro* selection and characterization of DNA aptamers target to β -amyloid42 ($A\beta$ 42) [D]. Changsha: Hunan University, 2014.
- [12] GRABOWSKA I, SHARAMA N, VASILESCU A, et al. Electrochemical aptamer-based biosensors for the detection of cardiac biomarkers [J]. *ACS Omega*, 2018, 3(9): 12010-12018.
- [13] PAN Q, LAW C, YUNG M, et al. Novel RNA aptamers targeting gastrointestinal cancer biomarkers CEA, CA50 and CA72-4 with superior affinity and specificity [J]. *PLoS One*, 2018, 13(10): e198980.
- [14] AMOUZADEH T M, FERRE-BORRULL J, MARSAL L F. Highly sensitive aptasensor based on interferometric reflectance spectroscopy for the determination of amyloid beta as an Alzheimer's disease biomarkers using nanoporous anodic alumina [J]. *Biosens Bioelectron*, 2019(137): 279-286.
- [15] CHAI Y, LI X, YANG M. Aptamer based determination of the cancer biomarker HER2 by using phosphate-functionalized MnO_2 nanosheets as the electrochemical probe [J]. *Mikrochim Acta*, 2019, 186(5): 316. Doi: 10.1007/s00604-019-3412-y.
- [16] HONG M J, REN Q Y, JIN J K, et al. Research progress of single-domain antibody [J]. *Chin J Pharm Biotec*, 2018, 25(6): 90-94.
- [17] PAN X, PAN B J, CAI J L, et al. Research progress in single-domain antibody [J]. *Chin Bull Life Sci*, 2012, 24(5): 404-410.
- [18] KAVOUSIPOUR S, MOKARRAM P, GARGARI S, et al. A comparison between cell, protein and peptide-based approaches for selection of nanobodies against CD44 from a synthetic library [J]. *Protein Pept Lett*, 2018, 25(6): 580-588.
- [19] FARAJI F, TAJIK N, BEHDANI M, et al. Development and characterization of a camelid single-domain antibody directed to human CD22 biomarker [J]. *Biotechnol Appl Biochem*. 2018, 65(5): 718-725.
- [20] WANG H, MENG A M, LI S H, et al. A nanobody targeting carcinoembryonic antigen as a promising molecular probe for non-small cell lung cancer [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(1): 625-630.
- [21] REN X, YAN J, WU D, et al. Nanobody-based apolipoprotein E immunosensor for point-of-care testing [J]. *ACS Sens*, 2017, 2(9): 1267-1271.
- [22] ZHENG Z, WU L, LI L, et al. Simultaneous and highly sensitive detection of multiple breast cancer biomarkers in real samples using a SERS microfluidic chip [J]. *Talanta*, 2018(188): 507-515.
- [23] YANG H, XIANG Y, GUO X, et al. Diazo-reaction-based SERS substrates for detection of nitrite in saliva [J]. *Sensors Actuators B: Chemical*, 2018(271): 118-121.
- [24] ZHOU L, ZHOU J, FENG Z, et al. Immunoassay for tumor markers in human serum based on Si nanoparticles and $SiC@Ag$ SERS-active substrate [J]. *Analyst*, 2016, 141(8): 2534-2541.
- [25] YI X Y. Investigation of biomarkers of neurodegenerative diseases and cancers by surface plasmon resonance and electrochemistry [D]. Changsha: Central South University, 2014.
- [26] PENG Z. Simultaneous detection of free and total prostate specific antigen using dual channel surface plasmon resonance based on gold nanoparticles signal amplification [D]. Changsha: Central South University, 2013.
- [27] WANG H, WANG X, WANG J, et al. A SPR biosensor based on signal amplification using antibody-QD conjugates for quantitative determination of multiple tumor markers [J]. *Sci Rep*, 2016(6): 33140. Doi: 10.1038/srep33140.
- [28] VERGARA D, BIANCO M, PAGANO R, et al. An SPR based immunoassay for the sensitive detection of the soluble epithelial marker E-cadherin [J]. *Nanomedicine*. 2018, 14(7): 1963-1971.
- [29] 吴建伟. 化学发光免疫分析技术的临床应用及研究进展[J]. *中国实用医药*, 2010, 5(34): 258-259.
- [30] 何继宏. 肿瘤生物标志物检验中化学发光免疫法的应用价值[J]. *深圳中西医结合杂志*, 2018, 28(9): 61-63.
- [31] HU B, LI J, MOU L, et al. An automated and portable

- microfluidic chemiluminescent immunoassay for quantitative detection of biomarkers [J]. *Lab Chip*, 2017, 17(13): 2225-2234.
- [32] JANKOWSKA E A, FILIPPATOS G S, HAEHLING S, et al. Identification of chronic heart failure patients with a high 12-month mortality risk using biomarkers including plasma C-terminal pro-endothelin-1 [J]. *PLoS One*, 2011, 6(1): e14506.
- [33] GUO L N, HE H Q. Development of an immunochromatographic test strip for the detection of anti-CCP antibody based on quantum dots [J]. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2013, 29(4): 389-395.
- [34] KIM C, SEARSON P C. Magnetic bead-quantum dot assay for detection of a biomarker for traumatic brain injury [J]. *Nanoscale*, 2015, 7(42): 17820-17826.
- [35] LIU L, WU S, JING F, et al. Bead-based microarray immunoassay for lung cancer biomarkers using quantum dots as labels [J]. *Biosens Bioelectron*, 2016(80): 300-306.
- [36] LEE I, LUO X, CUI X T, et al. Highly sensitive single polyaniline nanowire biosensor for the detection of immunoglobulin G and myoglobin [J]. *Biosens Bioelectron*, 2011, 26(7): 3297-3302.
- [37] ZHANG Y. Research on accumulation and sensing of PAHs exposure biomarkers based on grapheme [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2015.
- [38] LI L, FENG D, ZHANG Y. Simultaneous detection of two tumor markers using silver and gold nanoparticles decorated carbon nanospheres as labels [J]. *Anal Biochem*, 2016(505): 59-65.
- [39] MONTELEONE M, NACCARATO A, SINDONA G, et al. A reliable and simple method for the assay of neuroendocrine tumor markers in human urine by solid-phase microextraction-gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry [J]. *Anal Chim Acta*, 2013(759): 66-73.
- [40] JENG L B, LO W Y, HSU W Y, et al. Analysis of urinary nucleosides as helper tumor markers in hepatocellular carcinoma diagnosis [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2009, 23(11): 1543-1549.
- [41] MENG H, ZHU X, LI L, et al. Identification of CALM as the potential serum biomarker for predicting the recurrence of nasopharyngeal carcinoma using a mass spectrometry-based comparative proteomic approach [J]. *Int J Mol Med*, 2017, 40(4): 1152-1164.
- [42] CIESLAROVA Z, LOPES F S, DO L C, et al. Capillary electrophoresis tandem mass spectrometry determination of glutamic acid and homocysteine's metabolites: Potential biomarkers of amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Talanta*, 2017(170): 63-68.
- [43] GIRALDEZM D, CHEVILLET J R, TEWARI M. Droplet digital PCR for absolute quantification of extracellular microRNAs in plasma and serum: quantification of the cancer biomarker hsa-miR-141 [J]. *Methods Mol Biol*, 2018(1768): 459-474.
- [44] GUTTERIDGE A, RATHBONEV M, GOBBONS R, et al. Digital PCR analysis of circulating tumor DNA: a biomarker for chondrosarcoma diagnosis, prognostication, and residual disease detection [J]. *Cancer Med*, 2017, 6(10): 2194-2202.

收稿日期: 2019-03-07

(本文责编: 蔡珊珊)