

基于聚集诱导发光分子的 免标记癌胚抗原生物传感新方法研究

李海银 常加富 吕文欣 李峰*

(青岛农业大学化学与药学院, 青岛 266109)

摘 要 基于目标物诱导酶循环放大反应,借助 Hemin/G-四链体对 *L*-半胱氨酸(*L*-Cys)的催化氧化作用,构建了聚集诱导发光(AIE)分子介导的荧光生物传感器,实现了癌胚抗原(CEA)的免标记、高灵敏检测。以弱发光的马来酰亚胺功能化四苯乙烯(TPE-M)作为信号源,其可与 *L*-Cys 反应,使荧光增强。当目标物存在时,CEA 引发聚合酶/内切酶辅助的循环放大反应,原位生成大量 Hemin/G-四链体,其催化氧化 *L*-Cys 变成胱氨酸(Cys-cys),阻止 *L*-Cys 与 TPE-M 反应,致使传感体系的荧光强度降低;当 CEA 不存在时,*L*-Cys 可继续与 TPE-M 反应,体系荧光信号增强。基于体系中荧光信号的变化,即可实现 CEA 的免标记、高灵敏检测,检出限为 0.033 fmol/L。本传感器具有优异的选择性、稳定性与抗干扰能力,为生物样品中 CEA 的灵敏与准确检测提供了新方法。

关键词 聚集诱导发光; 免标记; 癌胚抗原; 荧光; 生物传感器

1 引言

近年来,大量研究表明,癌胚抗原(CEA)的表达与肺癌、乳腺癌、结直肠癌等众多疾病相关,被认为是具有临床诊断价值的肿瘤标志物之一^[1,2]。灵敏与准确检测生物体内 CEA 的表达对相关疾病的早期诊断与有效治疗具有重要的研究价值与现实意义。但是,生物体内 CEA 的检测存在表达水平低、干扰物质多等难点,对发展新型高性能的 CEA 传感器提出了更严格的要求。目前,比色法^[3,4]、化学发光法^[5,6]、荧光法^[7,8]、电化学方法^[9,10]、拉曼光谱法^[11,12]等技术均已被用于构建 CEA 传感器,其中,荧光法因具有简单、快速、灵敏等优点而备受关注,被认为是实现生物体内 CEA 灵敏与准确检测的理想手段。然而,目前报道的 CEA 荧光生物传感器面临很多因素限制:(1)信号单元多为罗丹明、荧光素、青色素、金属簇等^[13~15],稳定性不佳、发光效率低、抗光学漂白性不强,存在严重的聚集诱导淬灭效应;(2)大多数信号分子均需标记^[16,17],该过程需要严格控制实验条件,耗时、费力、复杂、繁琐,导致探针的构建成本高;(3)碳点与量子点虽可作为信号源实现 CEA 的免标记荧光检测^[18,19],但碳点的低发光效率与弱稳定性、量子点的高毒性严重限制了其在 CEA 免标记检测中的广泛应用。因此,设计高性能的新型信号分子、发展新型免标记的分析策略,对构建用于检测生物体内 CEA 的传感平台具有重要意义。

聚集诱导发光(AIE)材料,稀溶液时不发光,聚集态下强烈发光,易于化学修饰剪裁,具有较强的抗光学漂白能力和较高的荧光量子产率,广泛应用于有机电致化学发光^[20]、细胞成像^[21]、肿瘤治疗^[22]、分析传感检测^[23]等方面,并取得了一系列重要的研究成果。发展以 AIE 材料作为信号分子的生物传感平台有望解决传统荧光信号分子性能低的关键技术难题,极大地提高检测灵敏度、选择性与准确性,受到了研究者的广泛关注。Lu 等^[24]以 AIE 材料作为信号源制备了用于检测 K^+ 的荧光探针,并进一步将其用于细胞内 K^+ 的原位成像;Zhuang 等^[25]设计并合成了阳离子 AIE 染料 TPE-Py,基于目标物延长端粒的特性,实现了端粒酶的灵敏、特异性检测与细胞内原位成像。文献报道的设计策略主要有两种:AIE 分子与核酸链的化学标记、阳离子 AIE 染料与核酸链的静电吸附。利用静电吸附策略虽可解决标记的难题,但阳离子 AIE 染料稳定性差,易受到生物体内阴离子的干扰,降低检测的准确度。目前,基于 AIE 材料构建用于 CEA 分析检测的传感平台未见有文献报道。

2020-05-22 收稿; 2020-07-02 接受

本文系国家自然科学基金项目(Nos. 21605093, 21775082)资助

* E-mail: lifeng@qau.edu.cn

本研究以弱发光的马来酰亚胺功能化的四苯乙烯(TPE-M)作为信号源,基于酶辅助的循环放大反应,在 *L*-半胱氨酸(*L*-Cys)存在下,实现了 CEA 的免标记、高灵敏荧光检测。*L*-Cys 与 TPE-M 反应,促使其荧光增强。目标物 CEA 识别夹夹 HP,改变其构型,进一步引发聚合酶与内切酶辅助的循环放大反应,生成大量 Hemin/G-四链体,可催化氧化 *L*-Cys 变成胱氨酸(Cys-cys),而 Cys-cys 无法与 TPE-M 反应点亮其荧光。利用 CEA 加入前后,溶液中不同浓度的 *L*-Cys 与 TPE-M 反应导致的荧光强度的变化,实现体系中目标物的免标记、高灵敏检测。本研究将 AIE 材料集成于免标记检测 CEA 的生物传感平台中,方法简单、快速、灵敏,具有重要的实际应用价值。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

F-4600 荧光光谱仪(日本日立公司); Gel Doc XR + 凝胶成像系统(美国伯乐公司)。
Klenow fragment 聚合酶(KF 聚合酶)、单核苷酸(dNTPs)、RNase 抑制剂与三(羟甲基)甲基氨基甲烷(Tris)均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。癌胚抗原(CEA)及其干扰物(上海领潮生物科技有限公司);核酸切割酶 Nt. BbvCI(美国新英格兰生物实验室);其它试剂购自上海安耐吉化学公司。Tris-HCl 缓冲溶液(pH 8.0,含有 10 mmol/L Tris、50 mmol/L NaCl、10 mmol/L MgCl₂)与 1.0 mmol/L 二硫苏糖醇,用于本实验中 DNA 溶液的配制。信号分子 TPE-M 参考文献[26,27]报道的方法合成,溶于乙腈,制备成浓度为 400 μmol/L 的溶液。实验中所用的核酸片段由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,序列见表 1。

表 1 本实验所用核酸序列
Table 1 DNA sequences used in this work

名称 Name	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')
G-四链体 DNA G-quadruplex DNA (G1)	TCAGCTGGGTGGGCGGGATGGG
非 G-四链体 DNA Non-G-quadruplex DNA (N1)	TCAGCTGTGGTGTGGTGTGG
模板 DNA Template DNA (P1)	CCCATCCCGCCCAACCCAGCTGAGGCATACCAGCTGCTGAGGCATACCAGCT
发卡 DNA Hairpin DNA (HP)	CATACCAGCTTATTCAATTCAGCTGCTATG
模板 DNA Template DNA (P1')	CCAACCACACCAACCACAGCTGAGGCATACCAGCTGCTGAGGCATACCAGCT
发卡 DNA Hairpin DNA(HP')	TGAGGTAGTATATTCAATTCTACTACCTCA

2.2 CEA 的免标记荧光检测

将 HP 溶液在 95℃ 孵育 5 min,自然冷却至室温,备用。50 μL 含有 400 nmol/L HP、400 nmol/L P1、1.2 U/μL KF 聚合酶、0.8 U/μL Nt. BbvCI、2000 μmol/L dNTPs 和不同浓度 CEA 的溶液在 25℃ 下反应 120 min,随后升温至 90℃ 反应 10 min。冷却后,向其中加入含有 8.0 μmol/L Hemin 的 50 μL Tris-HCl 缓冲溶液,并继续反应 45 min;接着向其中加入含有 200 μmol/L Cys 的 20 μL Tris-HCl 缓冲溶液,反应 30 min 后,将 10 μL TPE-M(400 μmol/L)溶液、70 μL Tris-HCl 缓冲溶液与上述反应溶液混合,继续孵育 20 min,进行荧光分析检测。荧光测量电压为 700 V,激发波长为 365 nm,狭缝为 5.0 nm,光谱采集范围为 400 ~ 650 nm。

3 结果与讨论

3.1 TPE-M/*L*-Cys 荧光传感体系的构建与表征

对制备的 TPE-M 的荧光性能及 TPE-M 对 *L*-Cys 的荧光响应特性进行了考察。如图 1A 所示,受限于马来酰亚胺结构的强吸电子能力,TPE-M 发光较弱,其荧光强度仅为 57.60 a. u.。向其中加入 *L*-Cys 后,荧光强度大大增加,达到 517.3 a. u.。从荧光照片中可更直接地观察到荧光强度的增加:TPE-M 溶液几乎无荧光,而 TPE-M+*L*-Cys 溶液则发射出强烈的天蓝色荧光。上述结果均表明,TPE-M 对 *L*-Cys 有优异的响应性。基于加入 *L*-Cys 后 TPE-M 的荧光强度显著增加的特性,并参考文献[28],推测 TPE-M 与 *L*-Cys 作用机理如图 1B 所示:*L*-Cys 分子上的巯基与 TPE-M 上马来酰亚胺的双键发生迈克尔加成反

应,生成稳定的加成物 TPE-M-L,双键被破坏,抑制了分子内的光诱导电荷转移(PET),促使荧光增强。

Hemin/G-四链体具有类辣根过氧化物酶活性^[29,30],可催化体系中的溶解氧氧化 *L*-Cys 为 Cys-cys。*Cys-cys* 相对 *L*-Cys 而言不含巯基,因此无法破坏 TPE-M 上马来酰亚胺的双键增强体系中的荧光信号(图 1C)。基于 Hemin/G-四链体对 *L*-Cys 的催化氧化作用、TPE-M 对 *L*-Cys 响应以及 *L*-Cys 与 *Cys-cys* 的分子结构差异,推测 TPE-M/*L*-Cys 体系对 G-四链体 DNA 有特异的响应性。为验证此推测,将 G-四链体 DNA(G1)与非 G-四链体 DNA(N1)分别与 *L*-Cys 进行预孵育,然后再与 TPE-M 进行反应,结果如图 1D 所示。当 G1 与 N1 均不存在时,体系荧光信号较高,且其强度随预孵育时间变化很小;当 G1 存在时,随着孵育时间延长,荧光强度逐渐降低,在 30 min 时达到最低值;当 N1 存在时,随着时间延长,检测体系荧光强度保持稳定,没有发生变化。实验结果表明,TPE-M/*L*-Cys 体系可特异性地识别 G-四链体 DNA。

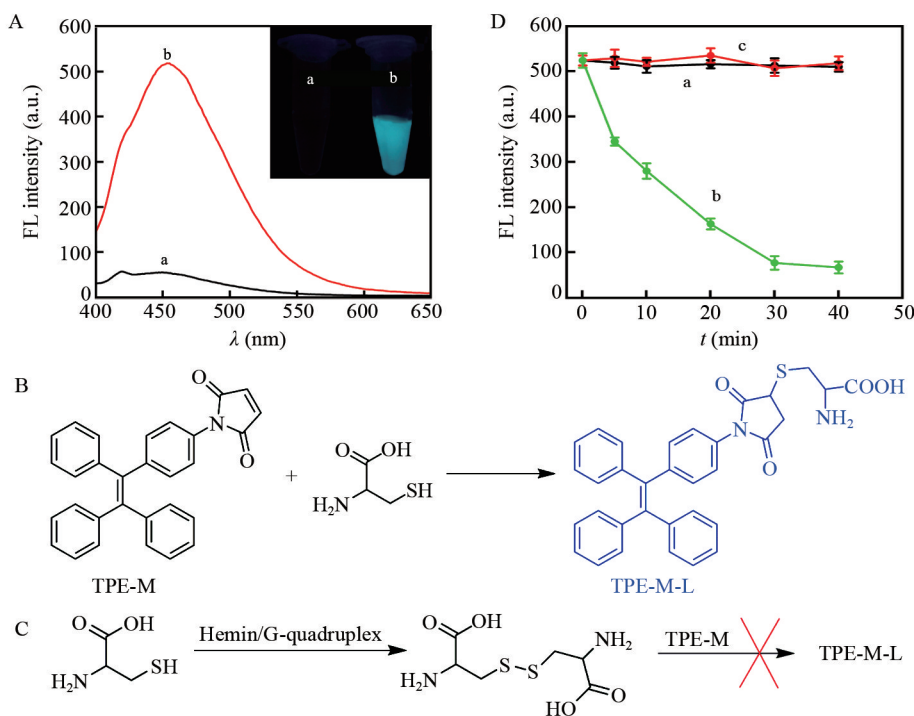


图 1 (A)不同体系的荧光光谱(插图为相应的荧光照片):(a)TPE-M,(b)TPE-M + *L*-Cys;(B)*L*-Cys 与 TPE-M 的反应路线;(C)Hemin/G-四链体对 TPE-M/*L*-Cys 作用的示意图;(D)*L*-Cys 与空白样品(a)、G1 (b)、N1(c)预孵育后与 TPE-M 反应体系荧光强度随预孵育时间的变化

Fig.1 (A) Fluorescent spectra of different systems: (a) maleimide-functionalized tetraphenylethene (TPE-M), (b) TPE-M + *L*-Cys, and inset is images of (a) and (b) under excitation of 365 nm light; (B) Reaction route of *L*-Cys and TPE-M; (C) Interaction illustration of TPE-M + *L*-Cys with hemin/G-quadruplex; (D) FL intensity of the sensing system in the presence of TPE-M versus pre-reaction time between: (a) *L*-Cys+ blank, (b) *L*-Cys + G1, and (c) *L*-Cys + N1

3.2 实验原理

基于上述实验结果,借助酶辅助的循环放大反应,将 TPE-M/*L*-Cys 体系用于检测 CEA,其实验原理如图 2 所示。首先,设计发卡探针 HP 与模板探针 P1 序列,以保证目标物存在条件下指数扩增反应的顺利进行。HP 分为 3 个部分:Ⅰ、Ⅱ与Ⅲ,其中,Ⅰ与Ⅱ为 CEA 的适配体序列,可特异性识别结合 CEA;Ⅲ与 P1 中的 I* 或 II* 互补;Ⅰ与Ⅲ为发卡 HP 的茎,Ⅱ为发卡 HP 的环。P1 被 *Nt*. BbvCI 内切酶识别位点(5'-GCTGAGG-3')分为 3 个部分:Ⅰ*、Ⅱ*与Ⅲ*,其中 I* 与 II* 相同,Ⅲ* 与 G1 互补。当目标物不存在时,HP 保持发卡构象,与 P1 不发生反应(图 3A-a, b, c),因此无法引发指数扩增反应生成大量 Hemin/G-四链体,也无法阻止 *L*-Cys 与 TPE-M 反应,故检测体系发出强烈的荧光信号。当 CEA 存在时,

CEA 与 HP 中 I 与 II 特异性结合形成 CEA@HP 络合物,引发 HP 构象变化,暴露出片段 III (图 3A-d)。暴露出的片段 III 与模板 P1 杂交生成新的络合物,因此,CEA@HP 络合物对应的条带消失,同时在其后出现一个新的条带 (图 3A-e)。加入 KF 聚合酶和 Nt. BbvCI 内切酶后,引发指数扩增反应,合成出大量 s1 与 s2 核酸片段,同时释放出 CEA。其中,生成的 s1 与未反应的 P1 继续杂交,释放的 CEA 继续识别未反应的 HP,新引发若干个指数扩增反应,生成大量核酸片段 s2。因此,在泳道 f 最前方出现一个新的条带,与 G1 条带的位置相当,进一步证实了富含 G 碱基的 s2 核酸片段的生成。在 K^+ 与 Hemin 存在下,s2 形成大量 Hemin/G-四链体,催化氧化 *L*-Cys 变成 Cys-cys,阻止 *L*-Cys 与 TPE-M 的反应,致使荧光信号降低。

3.3 可行性分析

为验证所设计的传感器用于 CEA 免标记分析检测的可行性,测定了不同体系的荧光响应 (图 3B)。当 CEA 不存在时,*L*-Cys 与 TPE-M 反应,产生较强的荧光信号 (516.9 a. u.),其与 TPE-M/*L*-Cys 体系的荧光强度相当,表明溶液中存在的 DNA 片段、生物酶、核苷酸、Hemin 等对 TPE-M/*L*-Cys 体系的影响非常小。加入 10 fmol/L CEA 后,体系的荧光强度降低至 271.8 a. u.,这主要归因于 CEA 引发指数扩增反应生成大量 Hemin/G-四链体,进而催化氧化 *L*-Cys,阻止其与 TPE-M 的反应,降低荧光强度。继续增加 CEA 浓度至 200 fmol/L,荧光强度继续降低,表现出明显的负相关关系,进一步证实了实验原理的可行性;越多的 *L*-Cys 引发指数扩增反应生成越多的 s2,催化消耗越多的 *L*-Cys,进而大幅度降低荧光信号。上述实验结果表明,基于 TPE-M/*L*-Cys 体系构建免标记传感平台用于 CEA 的荧光分析检测是可行的。

HP 与 P1 不仅具有识别 CEA 的功能,同时也有保证指数扩增反应顺利进行的作用。因此,利用 HP'和 P1'分别取代 HP 和 P1 构建传感体系,考察传感体系对 CEA 的荧光响应行为 (图 3C)。HP'不含有 CEA 适配体序列,P1'不含有与 G1 互补的序列。当 HP'取代 HP 后,检测体系呈现较强的荧光信号,远大于 HP 构建的传感器检测到的荧光强度。这主要是因为 HP'无法识别 CEA,因此构象不发生变化,无法引发循环放大反应产生 G-四链体,也不能阻止 *L*-Cys 与 TPE-M 的反应。当用 P1'代替 P1 后,检测体系的荧光信号依然很高,大于 P1 存在时体系的荧光强度。这主要是因为 HP 虽可识别 CEA 引发循环放大反应产生大量核酸片段,但产生的核酸片段不是 G-四链体 DNA,因此无法形成 Hemin/G-四链体进而阻止 *L*-Cys 与 TPE-M 的反应。因此,合理、巧妙地设计 HP 和 P1 的核酸序列才能保证 CEA 免标记检测的顺利进行。

3.4 实验条件优化

Hemin/G-四链体的产生与 CEA 的传感性能相关,因此对影响 Hemin/G-四链体产生的因素包括 HP 的浓度、P1 的浓度及反应时间进行了优化 (图 4A)。随着发卡探针 HP 浓度增大,检测体系荧光强度逐渐减小,在 100 nmol/L 时达到最低值,因此,最适的 HP 浓度为 100 nmol/L。按照同样方法进行考察,发现 P1 的最适浓度为 100 nmol/L (图 4B)。如图 4C 所示,随着酶反应时间延长 (30 ~ 120 min),荧光强度逐渐降低;继续延长酶反应时间 (120 ~ 180 min),放大效果增加不明显。基于此,选择最佳的酶辅助反应时间为 120 min。

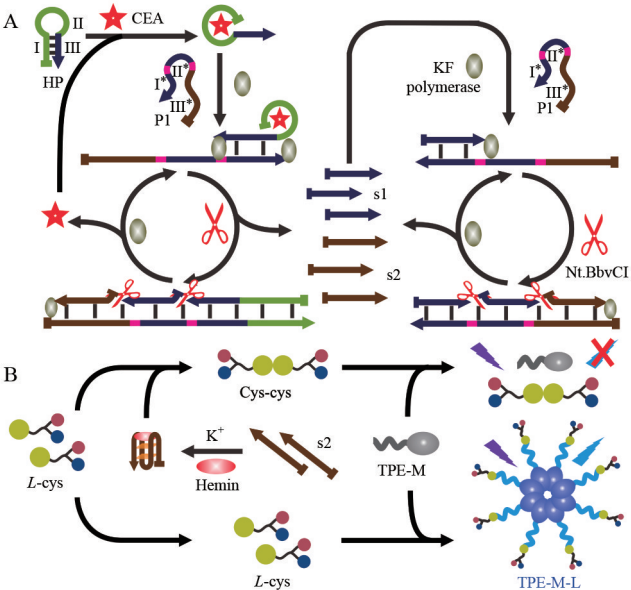


图2 基于 TPE-M/*L*-Cys 体系免标记、高灵敏检测 CEA 的原理图
Fig. 2 Principle of TPE-M/*L*-Cys based biosensor for carcinoembryonic antigen (CEA) analysis based on target-initiated cyclic amplification reaction

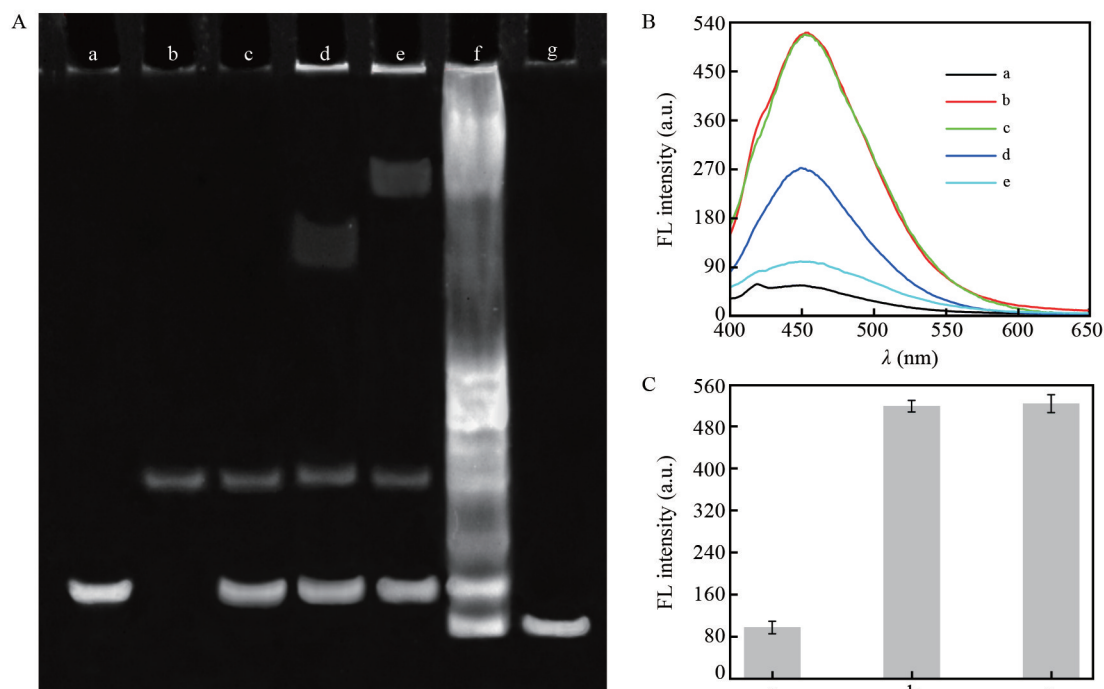


图 3 (A)凝胶电泳图:(a) HP, (b) P1, (c) HP + P1, (d) HP + CEA, (e) HP + CEA + P1, (f) HP + CEA + P1 + KF 聚合酶 + dNTPs + Nt. BbVCl, (g) G1; (B)不同体系的荧光光谱曲线:(a) TPE-M, (b) TPE-M + L-Cys, (c) HP + P1+ TPE-M + L-Cys + KF 聚合酶 + dNTPs + Nt. BbVCl, (d) HP + P1 + 10 fmol/L CEA + TPE-M + L-Cys + KF 聚合酶 + dNTPs + Nt. BbVCl, (e) HP + P1 + 200 fmol/L CEA + TPE-M + L-Cys + KF 聚合酶 + dNTPs + Nt. BbVCl; (C)不同 DNA 构建的探针对检测 200 fmol/L CEA 的响应:(a) HP + P1, (b) HP' + P1, (c) HP + P1'

Fig. 3 (A) Non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis verification of the CEA-initiated cyclic amplification process: (a) HP, (b) P1, (c) HP + P1, (d) HP + CEA, (e) HP + CEA + P1, (f) HP + CEA + P1 + KF polymerase + dNTPs + Nt. BbVCl, (g) G1; (B) Fluorescent spectra of different systems: (a) TPE-M, (b) TPE-M + L-Cys, (c) the solution containing all components in the absence of CEA, (d) the solution containing all components in the presence of 10 fmol/L CEA, and (e) the solution containing all components in the presence of 200 fmol/L CEA; (C) FL intensity of the detection systems toward 200 fmol/L CEA under different conditions: (a) HP + P1, (b) HP' + P1, (c) HP + P1'

在反应过程中,为了提高酶的活性、减少核酸片段的降解,加入 DTT 作为强效还原剂。但是,DTT 含有自由的巯基,可与 TPE-M 反应,点亮其荧光,干扰 CEA 的分析检测。为消除 DTT 对传感体系的干扰,对扩增后的溶液进行 90℃ 热处理,考察了作用时间对荧光强度的影响(图 4D)。未进行热处理的体系在 CEA 存在时仍表现出较强的荧光信号,这主要是因为 CEA 虽可引发指数扩增反应生成大量 Hemin/G-四链体,进而消耗 L-Cys,阻止其与 TPE-M 反应,但体系中存在的大量 DTT 可与 TPE-M 反应。随着热处理时间延长,体系荧光强度逐渐降低,在 10 min 达到最低值。这表明 90℃ 热处理 10 min,可高效消除检测体系中存在的巯基化合物,提高检测的准确度。

3.5 传感性能分析

在最佳条件下,考察了本传感器对 CEA 的检测性能。如图 5A 所示,在 0.1 ~ 200 fmol/L 范围内,随着 CEA 浓度的增加,体系荧光强度逐渐降低。以 453 nm 处的荧光强度 (F_{453}) 为纵坐标、CEA 浓度的对数 ($\lg C_{\text{CEA}}$) 为横坐标,绘制工作曲线(图 5B),结果表明, F_{453} 与 $\lg C_{\text{CEA}}$ 呈良好的线性关系,线性方程为 $F_{453} = -128.46 \lg C_{\text{CEA}} + 400.69$, ($R^2 = 0.9965$),检出限为 0.033 fmol/L ($S/N = 3$)。与文献报道的检测 CEA 的方法相比(表 2),本方法灵敏度和检出限与之相当或更优。

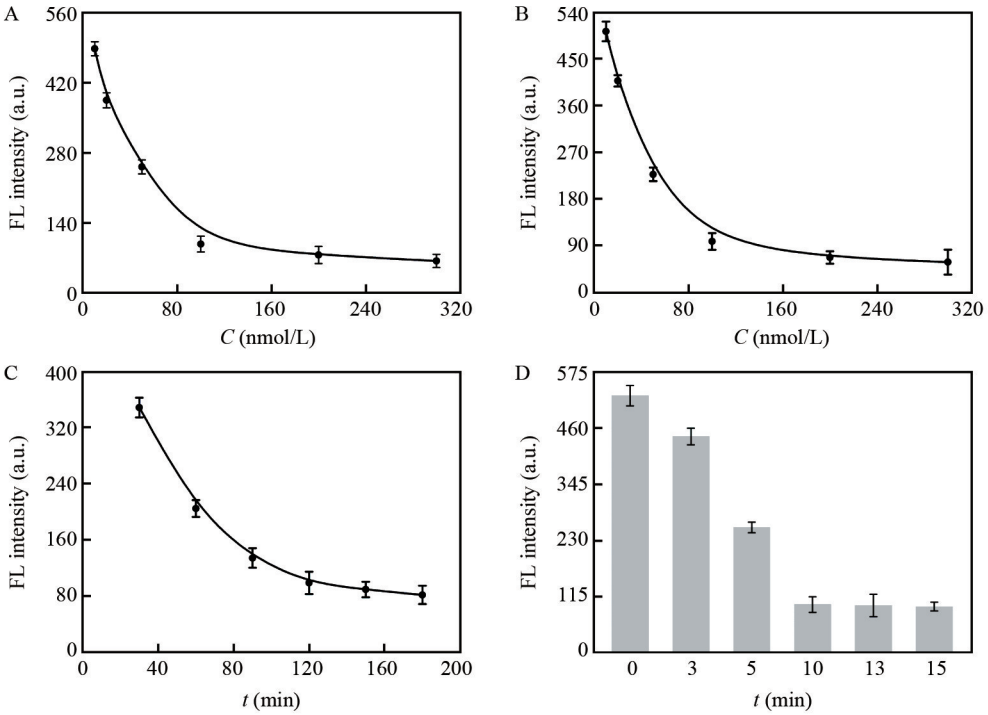


图4 HP用量(A)、P1用量(B)、反应时间(C)和不同热处理(90℃)时间(D)对AIE传感体系荧光响应的影响,CEA浓度为200 fmol/L

Fig.4 Effect of HP dosage (A), P1 dosage (B), incubation time (C) and heat-treatment time at 90°C (D) on fluorescence signal of TPE-M/L-Cys system toward 200 fmol/L CEA

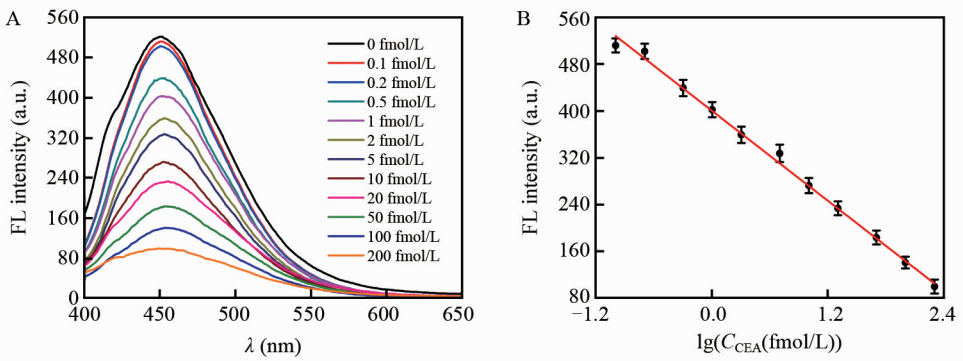


图5 (A)不同浓度CEA存在下TPE-M/L-Cys体系的荧光光谱;(B)TPE-M/L-Cys体系的荧光强度与CEA浓度的线性曲线

Fig.5 (A) Fluorescent curves of TPE-M/L-Cys system in the presence of different concentrations of CEA; (B) Linear relationship of FL signal versus logarithm of CEA concentration

表2 不同CEA检测方法性能比较

Table 2 Comparison of CEA assay performances of the proposed strategy with reported methods

检测方法 Method	线性范围 Linear range	检出限 Detection limit	参考文献 Ref.
电化学 Electrochemistry	0.01 ~2.5 pmol/L	7.5 fmol/L	[31]
电化学 Electrochemistry	0.005 ~0.1 fmol/L	2.5 amol/L	[32]
化学发光 Chemiluminescence	0.8 pmol/L ~8 nmol/L	7.5 pmol/L	[33]
化学发光 Chemiluminescence	0.05 ~500 pmol/L	0.034 pmol/L	[34]
荧光 Fluorescence	0.5 ~50 pmol/L	0.5 pmol/L	[35]
荧光 Fluorescence	50 fmol/L ~50 nmol/L	50 fmol/L	[36]
荧光 Fluorescence	0.1 ~200 fmol/L	0.033 fmol/L	本工作 This work

考察了本传感器对 CEA 检测的选择性。在同样条件下,采用200 fmol/L 的 AFP、CA125 与 CA199 进行了验证。如图 6A 所示,当且仅当 CEA 存在时,检测体系的荧光信号才大幅度降低,而 AFP、CA125 与 CA199 并不能引起体系的荧光强度降低,这表明 HP 适配体具有特异性识别 CEA 的能力。将 AFP、CA125、CA199 与 CEA 混合后再进行检测,检测体系的荧光信号仍很低,其数值与 CEA 单独存在时相当,表明 AFP、CA125 与 CA199 的存在并不会对 CEA 的检测造成干扰,进一步证实本传感器具有优异的选择性与抗干扰能力。

为了验证构建的 AIE 传感器的稳定性,采用同样方法,在 20 $\mu\text{mol/L}$ KNO_3 、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 、葡萄糖 (Glucose)、甘氨酸 (Glycine)、谷氨酸 (Glutamic acid) 和谷胱甘肽 (GSH) 存在条件下,检测 200 fmol/L CEA(图 6B)。加入这些干扰物并未对检测体系的荧光信号产生影响,其原因为 90℃ 热处理可有效去除巯基化合物,表明本研究构建的 AIE 传感器具有优异的稳定性。

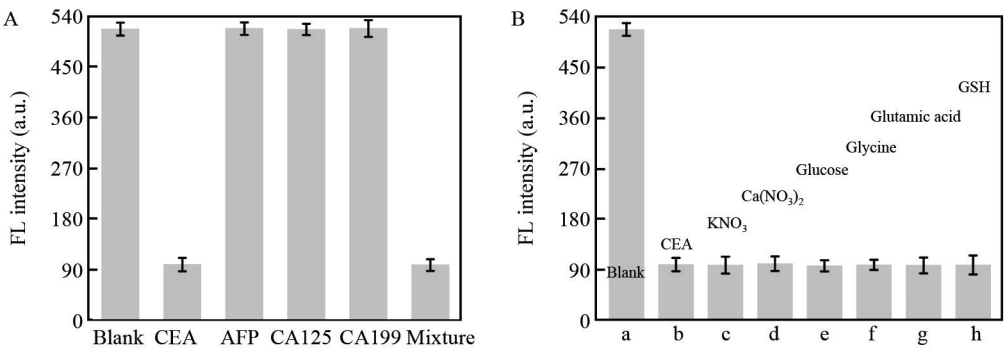


图 6 (A)不同分析物(200 fmol/L)存在下 TPE-M/L-Cys 体系的荧光强度; (B)干扰物对 TPE-M/L-Cys 体系检测 200 fmol/L CEA 强度的影响

Fig. 6 (A) FL intensity of TPE-M/L-Cys system upon the addition of CEA, α -fetoprotein (AFP), CA125, and CA129, and the mixture of these substances, respectively; (B) FL intensity of TPE-M/L-Cys system toward 200 fmol/L CEA in the presence of 200 $\mu\text{mol/L}$ different substances

3.6 实际样品分析

利用构建的 AIE 传感平台进行了血清样品中 CEA 的检测,结果见表 3。在 30% 稀释的血清中,5 个加标水平下的回收率分别为 97%、103%、96%、104% 和 105%,相对标准偏差<5%,表明本方法可用于实际样品中 CEA 的检测。

表 3 血清样品中 CEA 的检测结果
Table 3 Detection results of CEA in serum sample

序号 No.	加标值 Added (fmol/L)	测得值 Found (fmol/L)	回收率 Recovery (%)	相对标准偏差 RSD (%, n=3)
1	1.7	1.7	97.0	2.5
2	5.8	6.0	103.0	2.6
3	13.4	12.9	96.0	3.5
4	27.9	29.0	104.1	3.8
5	45.2	47.4	105.0	4.6

4 结论

基于 Hemin/G-四链体对 L-Cys 的催化氧化作用、TPE-M 对 L-Cys 响应以及 L-Cys 与 Cys-cys 的分子结构差异,结合目标物引发的酶辅助循环放大反应,构建了 AIE 材料介导的荧光生物传感器,实现了 CEA 的免标记、高灵敏检测。目标分子 CEA 引发指数扩增反应,产生大量 Hemin/G-四链体,催化氧化 L-Cys, 阻止 L-Cys 与 TPE-M 的反应,进而引起检测体系的荧光强度变化,实现对 CEA 的免标记、高灵敏检测,检出限低至 0.033 fmol/L。同时,此传感器具有优异的选择性、稳定性与抗干扰能力,可用于血清

中 CEA 的分析检测。本研究为建立免标记、灵敏的高性能荧光传感器提供了参考,拓宽了 AIE 材料的应用范围,在临床医学诊断领域具有较好的应用前景。

References

- 1 Qiu Z, Shu J, Liu J, Tang D. *Anal. Chem.*, **2019**, 91(2): 1260–1268
- 2 HAN Yu-Ping, CHEN Lin, LI Zhen, HU Cheng-Guo, LIU Zhi-Hong. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2018**, 46(8): 1178–1185
韩玉平, 谌林, 李贞, 胡成国, 刘志洪. *分析化学*, **2018**, 46(8): 1178–1185
- 3 Su S, Li J, Yao Y, Sun Q, Zhao Q, Wang F, Li Q, Liu X G, Wang L H. *ACS Appl. Bio. Mater.*, **2019**, 2(1): 292–298
- 4 Xiao L P, Zhu A M, Xu Q C, Chen Y, Xu J, Weng J. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2017**, 9(8): 6931–6940
- 5 Liu F R, Cao J T, Wang Y L, Fu X L, Ren S W, Liu Y M. *Sens. Actuators B*, **2018**, 276(10): 173–179
- 6 Yang N, Huang Y X, Ding G S, Fan A P. *Anal. Chem.*, **2019**, 91(7): 4906–4912
- 7 Zhao L J, Cheng M, Liu G N, Lu H Y, Gao Y, Yan X, Liu F M, Sun P, Lu G Y. *Sens. Actuators B*, **2018**, 273(10): 185–190
- 8 Jie G F, Li C L, Zhao Y, Kuang Q, Niu S Y. *ACS Appl. Nano Mater.*, **2019**, 2(7): 4637–4645
- 9 Jia Y L, Li Y Y, Zhang S A, Wang P, Liu Q, Dong Y H. *Biosens. Bioelectron.*, **2020**, 149(1): 111842
- 10 Ge L, Wang W X, Sun X M, Hou T, Li F. *Anal. Chem.*, **2016**, 88(4): 2212–2219
- 11 Lin X L, Wang Y Y, Wang L N, Lu Y D, Li J, Lu D C, Zhou T, Huang Z F, Huang J, Huang H F, Qiu S F, Chen R, Lin D, Feng S Y. *Biosens. Bioelectron.*, **2019**, 143(15): 111599
- 12 Bai X R, Wang L H, Ren J Q, Bai X W, Zeng L W, Shen A G, Hu J M. *Anal. Chem.*, **2019**, 91(4): 2955–2963
- 13 Yang X, Zhuo Y, Zhu S, Luo Y, Feng Y, Xu Y. *Biosens. Bioelectron.*, **2015**, 64: 345–351
- 14 Hai X M, Li N, Wang K, Zhang Z Q, Zhang J, Dang F Q. *Anal. Chim. Acta*, **2018**, 998: 60–66
- 15 Qian R C, Cao Y, Zhao L J, Gu Z, Long Y T. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2017**, 56(17): 4802–4805
- 16 Liu Q Y, Chen P P, Xu Z, Chen M M, Ding Y N, Yue K, Xu J. *Sens. Actuators B*, **2017**, 251: 339–348
- 17 Tzouvadaki I, Jolly P, Lu X L, Ingebrandt S, de Micheli G, Estrela P, Carrara S. *Nano Lett.*, **2016**, 16(7): 4472–4476
- 18 Jie G, Li C, Zhao Y, Kuang Q, Niu S. *ACS Appl. Nano Mater.*, **2019**, 2(7): 4637–4645
- 19 Miao H, Wang L, Zhuo Y, Zhou Z, Yang X. *Biosens. Bioelectron.*, **2016**, 86: 83–89
- 20 Huang W, Hu G B, Yao L Y, Yang Y, Liang W B, Yuan R, Xiao D R. *Anal. Chem.*, **2020**, 92(4): 3380–3387
- 21 Li J, Kwon N, Jeong Y, Lee S, Kim G, Yoon J. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2018**, 10(15): 12150–12154
- 22 Wu P, Wang X F, Wang Z G, Ma W, Guo J S, Chen J J, Yu Z Q, Li J Z, Zhou D F. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2019**, 11(20): 18691–18700
- 23 Li H Y, Lin H Y, Lv W X, Gai P P, Li F. *Biosens. Bioelectron.*, **2020**, 165: 112336
- 24 Lu D, He L, Wang Y, Xiong M, Hu M, Liang H, Huan S, Zhang X B, Tan W. *Talanta*, **2017**, 167: 550–556
- 25 Zhuang Y, Huang F J, Xu Q, Zhang M S, Lou X D, Xia F. *Anal. Chem.*, **2016**, 88(6): 3289–3294
- 26 Chang J F, Li H Y, Hou T, Duan W N, Li F. *Biosens. Bioelectron.*, **2018**, 104(1): 152–157
- 27 Chang J F, Li H Y, Hou T, Li F. *Biosens. Bioelectron.*, **2016**, 86(15): 971–977
- 28 Li H Y, Chang J F, Gai P P, Li F. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2018**, 10(5): 4561–4568
- 29 Zhou Y C, Ran X X, Chen A Y, Chai Y Q, Yuan R, Zhuo Y. *Anal. Chem.*, **2018**, 90(15): 9109–9116
- 30 Shen P, Li W, Liu Y, Ding Z, Deng Y, Zhu X, Jin Y, Li Y, Li J, Zheng T. *Anal. Chem.*, **2017**, 89(21): 11862–11868
- 31 Ren K W, Wu J, Ju H X, Yan F. *Anal. Chem.*, **2015**, 87(3): 1694–1700
- 32 Zhou J, Lai W Q, Zhuang J Y, Tang J, Tang D P. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2013**, 5(7): 2773–2781
- 33 Zong C, Wu J, Liu M M, Yang L L, Yan F, Ju H X. *Anal. Chem.*, **2014**, 86(19): 9939–9944
- 34 Xu J, Wu J, Zong C, Ju H X, Yan F. *Anal. Chem.*, **2013**, 85(6): 3374–3379
- 35 Lin Z Y, Zhang G Y, Yang W Q, Qiu B, Chen G N. *Chem. Commun.*, **2012**, 48(79): 9918–9920
- 36 Hu M, He Y, Song S P, Yan J, Lu H T, Weng L X, Wang L H, Fan C H. *Chem. Commun.*, **2010**, 46(33): 6126–6128

Aggregation Induced Emission Fluorogen-based Label-free Biosensor for Highly Sensitive Detection of Carcinoembryonic Antigen

LI Hai-Yin, CHANG Jia-Fu, LYU Wen-Xin, LI Feng*

(College of Chemistry and Pharmaceutical Sciences, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

Abstract A highly sensitive and label-free fluorescence carcinoembryonic antigen (CEA) biosensor was developed via target-triggered enzymatic recycling amplification reaction. In this strategy, aggregation induced emission fluorogen (AIEgen) TPE-M was chosen as a signal reporter to enhance the detection efficiency, as well as *L*-cysteine (*L*-cys) was utilized as a reactant to control over the fluorescence intensity due to its distinct capability of reacting with TPE-M and hemin/G-quadruplex. CEA triggered the *in-situ* generation of abundant hemin/G-quadruplex through polymerase/nicking enzyme-assisted recycling amplification, and the *in-situ* generated hemin/G-quadruplex catalyzed the destruction of *L*-cys. With *L*-cys consuming, a significantly decreased fluorescence was observed, demonstrating that the fluorescence intensity was relied on CEA amount. As a consequence, a facile, precise and sensitive strategy for CEA assay was readily realized. Furthermore, the detection limit was 0.033 fmol/L ($S/N=3$). The developed AIEgen-based biosensor provided a new method for sensitive and reliable detection of CEA in biological liquids, displaying a significant promise for CEA-related disease diagnosis.

Keywords Aggregation induced emission; Label-free; Carcinoembryonic antigen; Fluorescence; Biosensor

(Received 22 May 2019; accepted 2 July 2020)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 21605093, 21775082).