

糖基印迹电化学传感器的制备及乳腺癌 PD-L1 阳性外泌体的快速检测

罗奎¹, 林珈希², 李建平^{1,2}

(1. 桂林理工大学环境科学与工程学院;

2. 化学与生物工程学院, 桂林 541004)

摘要 构建了一种快速识别检测乳腺癌 PD-L1 阳性外泌体的糖基印迹电化学传感器. 以乳腺癌阳性外泌体糖蛋白 PD-L1 过表达的糖链 Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal 为模板分子, 3-氨基苯硼酸为功能单体, 采用电聚合法制备了糖基印迹聚合物(GIP); 经洗脱去除模板分子后得到了可特异性识别 PD-L1 阳性外泌体的印迹膜. 利用铁氰化钾作为探针测量了 GIP 电极的 DPV 电流值. 用 RIPA 裂解外泌体扣除游离蛋白干扰, 记录电流值变化(ΔI). ΔI 随着重吸附 PD-L1 阳性外泌体浓度的增大而逐渐降低, 并与浓度的对数值呈线性正相关, 检测范围为 $2.36 \times 10^2 \sim 1.18 \times 10^7$ particles/mL, 检出限为 93 particles/mL. 将该方法用于临床样本中乳腺癌 PD-L1 阳性外泌体的检测, 加标回收率为 93.82%~105.32%. 通过糖基化程度差异, 该传感器可用于临床样本中乳腺癌的筛查.

关键词 外泌体; 糖基印迹; 电化学传感器; PD-L1; 乳腺癌

中图分类号 O657.1

文献标志码 A

doi: 10.7503/cjcu20240524

Development of a Glycosyl-imprinted Sensor and Rapid Detection of PD-L1 Positive Exosomes in Breast Cancer

LUO Kui¹, LIN Jiayi², LI Jianping^{1,2*}

(1. College of Environmental Science and Engineering;

2. College of Chemistry and Bioengineering,

Guilin University of Technology, Guilin 541004, China)

Abstract A glycosylated electrochemical sensor for rapid identification and detection of breast cancer PD-L1 positive exosomes was developed. First, glycosyl-imprinted polymers (GIP) were prepared by electropolymerization using glyco-Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal overexpressed by breast cancer positive exosome glycoprotein PD-L1 as template molecules and 3-aminophenylboronic acid as functional monomers. After elution and removal of template molecules, an imprinted membrane that can specifically recognize PD-L1 positive exosomes was obtained. Potassium ferricyanide was used as a probe to measure the DPV current value of the GIP electrode. Exosomes were cleaved with RIPA to deduct free protein interference, and the change in current value (ΔI) was recorded. ΔI decreased with the increase of the concentration of reabsorbed PD-L1-positive exosomes, and was linearly positively related to the logarithmic value of the concentration. The detection range was $2.36 \times 10^2 \sim 1.18 \times 10^7$ particles/mL, and the detection limit was 93 particles/mL. The method has been used to detect breast cancer PD-L1-positive exosomes in clinical samples, and its spiked recoveries were 93.82%—105.32%. The sensor could be used to screen breast cancer in clinical samples by the difference in glycosylation degree.

收稿日期: 2024-11-29. 网络首发日期: 2025-02-14.

联系人简介: 李建平, 男, 博士, 教授, 主要从事电化学分析、化学与生物传感器方面的研究. E-mail: likianping@263.net

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 22264010)资助.

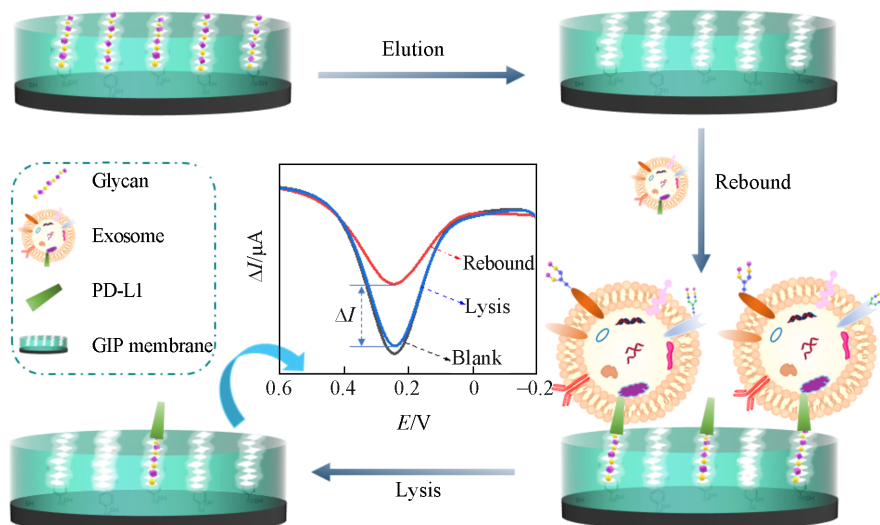
Supported by the National Natural Science Foundation of China(No.22264010).

Keywords Exosome; Glycosyl-imprinting; Electrochemical sensor; PD-L1; Breast cancer

乳腺癌是女性最常见也最致命的恶性肿瘤之一, 据估计, 2020年新发病例超过200万例, 死亡病例接近70万^[1,2]. 乳腺癌的早期诊断是提高患者治愈率的关键. 目前, 大多数的乳腺癌诊断技术基于成像技术、组织活检及超声检查等^[3,4]. 然而, 这些方法存在特异性低、易误诊、过程耗时、成本高等缺陷, 甚至可能加速癌症转移风险. 另一方面, 一些血清肿瘤标志物, 包括癌胚抗原、碳水化合物CA125、CA153和组织多肽抗原(TPA)等常用于临床检测, 但是低的特异性及敏感性会导致假阳性结果, 而且它们在早期乳腺癌的血液环境中含量极低, 难以准确检测^[5]. 因而, 并不适用于乳腺癌的早期诊断.

外泌体是细胞外囊泡的一种, 广泛分布于体液和组织介质中^[6]. 正常情况下由细胞分泌的外泌体携带与细胞本源类似的生物分子参与细胞间信息通讯和物质转移. 然而, 肿瘤外泌体与恶性细胞行为存在更为密切的联系, 包括刺激肿瘤细胞生长、抑制免疫反应、促进肿瘤细胞迁移和转移等^[7,8], 从而促使外泌体被视为最有吸引力的液体活检肿瘤生物标志物. 另一方面, 肿瘤发生或存在的情况下肿瘤细胞即可分泌高水平的外泌体^[9,10]. 同时, 肿瘤细胞衍生的外泌体会携带与肿瘤细胞相似的糖蛋白和糖基化特征, 而且糖蛋白过表达的糖基化特征还可作为区分正常细胞和肿瘤细胞的判定依据^[11,12]. 如乳腺癌外泌体会携带大量阳性糖蛋白程序性死亡配体1(PD-L1)^[13]. PD-L1被视为乳腺癌细胞避免免疫检查监视的理想指标, 其过表达的特征糖基化结构为Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal^[14,15]. 因此, 考量乳腺癌阳性外泌体的数量以及糖基化程度的差异, 可能是有效用于特异性筛查早期乳腺癌的方向之一. 目前, 外泌体的检测主要依靠蛋白质印迹(WB)、纳米颗粒追踪与分析(NTA)和酶联免疫吸附测定(ELISA)等, 存在预处理繁琐、检测时间长和样品需求量大等缺陷^[16,17]. 近年来, 一些新兴的检测方法, 如电化学法^[18]、比色法^[19]、荧光法^[20]及表面增强拉曼散射法^[21]等在外泌体检测中得到应用. 然而, 这些方法利用蛋白和核酸对外泌体进行识别和检测, 难以直接根据糖蛋白糖基化特征确定外泌体分属的肿瘤来源. 同时, 受限于所用抗体和核酸的稳定性和特异性, 增加了外泌体检测的成本和工序.

分子印迹技术是集分离与特异性识别一体化的方法, 其利用互补匹配的印迹孔穴来特异性地识别和结合目标分子^[22]. 为了应对大分子在印迹中存在的诸如传质阻力大以及印迹孔穴稳定性等难题^[23], 借鉴表位印迹策略, 近年来发展出了适用于含有糖基化的糖蛋白识别与检测的糖基印迹法^[24-26]. 基于乳腺癌衍生外泌体糖蛋白PD-L1的糖基化特性, 本文结合糖基印迹法和“门控制”技术构建了一种可特异性快速定量分析乳腺癌阳性PD-L1外泌体的电化学传感器(Scheme 1). 首先, 以3-氨基苯基硼酸为



Scheme 1 Preparation of glycosyl-imprinted sensor and quantitative detection of breast cancer positive PD-L1 exosomes

功能单体, PD-L1 上特征糖链 Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal 为模板分子, 在裸玻碳电极 (GCE) 表面采用电聚合法制备一层糖基印迹聚合物膜 (GIP). 然后, 通过碱液洗脱去除糖链, 形成可特异性识别糖链的印迹孔穴. 利用印迹孔穴特异性识别乳腺癌外泌体 PD-L1 的糖链进而捕获外泌体. 随着识别捕获外泌体浓度的增大, 印迹孔穴被堵塞越多, 探针响应信号降低. 随后用 RIPA 裂解液对印迹膜表面重吸附识别的外泌体进行裂解, 测定并扣除游离蛋白的响应信号, 从而实现乳腺癌外泌体的快速定量检测.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

糖链 Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal, 分析纯, 上海赛尔生化科技有限公司; C 反应蛋白 (CRP)、癌胚抗原 (CEA)、碳水化合物 724 (CA724)、心肌肌钙蛋白 I (CTnI)、抗坏血酸 (ASA)、白细胞介素-6 (IL-6) 和甲胎蛋白 (AFP), 分析纯, 上海领潮生物科技有限公司; 葡萄糖 (GLU)、3-氨基苯硼酸、抗坏血酸 (AA)、Na₂HPO₄·12H₂O、NaH₂PO₄·2H₂O、NaOH、KCl、K₃[Fe(CN)₆] 和 K₄[Fe(CN)₆], 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司; 放射免疫沉淀法缓冲液 (RIPA 裂解液), 上海翌圣生物科技股份有限公司; 实验用水为超纯水 (电阻率为 18.2 M Ω ·cm).

CHI660D 型电化学工作站, 上海辰华仪器有限公司; PGSTAT128N Autolab 型电化学工作站, 瑞士万通中国有限公司; JC2000X6 型接触角测量仪, 上海中辰数码科技设备有限公司; SU5000 型扫描电子显微镜 (SEM)、Ht-7700 型透射电子显微镜 (TEM) 和 CP100MX 型超速离心机, 北京日立科学仪器有限公司; Neofuge1600R 型高速冷冻离心机, 上海亚晶生物科技有限公司; N30E 型纳米流式检测仪, 山东海克尔生物科技有限公司; NT-MDT 型原子力电子显微镜 (AFM), 俄罗斯 NT-MDT 公司; Nicolet iS10 型傅里叶变换红外光谱仪, 赛默飞世尔科技有限公司.

1.2 实验过程

1.2.1 糖基印迹 (GIP) 及非糖基印迹 (nGIP) 传感器的制备 首先, 使用 0.05 μ m 氧化铝粉将玻碳电极 (GCE) 在麂皮上打磨抛光, 然后依次用 1:1 (体积比) 的硝酸、无水乙醇及超纯水清洗电极以去除残留物. 将处理好的 GCE 置于含 1.1 \times 10⁻⁵ mol/L 的糖链 Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal 和 2.0 \times 10⁻⁴ mol/L 3-氨基苯硼酸的 PBS 缓冲溶液 (0.2 mol/L, pH=7.4) 中, 采用循环伏安法 (CV) 电聚合制备 GIP 膜, 聚合电位为 0~1.0 V, 扫描速度为 50 mV/s, 扫描圈数为 30 圈. 随后, 以 1 mol/L NaOH 为洗脱剂洗脱去除糖链 6 min, 得到可特异性识别携带糖链的外泌体的印迹孔穴. 此外, 制备了 nGIP 与 GIP 传感器作为对比, 制备步骤相同, 但不添加糖链模板.

1.2.2 电化学测试方法 以 5.0 \times 10⁻³ mol/L 铁氰化钾 [Fe(CN)₆⁴⁻/Fe(CN)₆³⁻] 作为探针, 用 CV 和电化学阻抗谱 (EIS) 方法对制备的传感器进行了电化学表征, 其中 CV 的扫描电位范围为 -0.2~0.6 V, 扫描速率为 50 mV/s; 电化学交流阻抗 (EIS) 的频率范围为 100 mHz~100 kHz, 交变电压 5 mV. 采用差分脉冲伏安法 (DPV) 测定并记录传感器识别不同浓度外泌体及裂解前后响应信号变化, 扫描电位围为 -0.2~0.6 V, 扫描速率为 100 mV/s. 以上电化学测试均在室温下进行. 测试样品时, 在 GIP 膜上滴加 10 μ L 的外泌体溶液, 静态重吸附 60 min. 随后, 在 5.0 \times 10⁻³ mol/L 的 Fe(CN)₆⁴⁻/Fe(CN)₆³⁻ 探针溶液中, 采用 DPV 法测量电流值 I_1 . 为避免可能存在的携带糖链的游离蛋白对外泌体的干扰, 用 RIPA 裂解液对重吸附的外泌体进行裂解 6 min, 测量 DPV 电流值 I_2 . 计算 $\Delta I = I_1 - I_2$, 从而对外泌体浓度进行定量.

2 结果与讨论

2.1 PD-L1 阳性外泌体的表征

分别对 PD-L1 阳性外泌体 (源于 MDA-MB-231 细胞系) 的粒径、形貌及蛋白标志物进行了表征. 如图 1 所示, MDA-MB-231 阳性外泌体的平均粒径为 78 nm [图 1(A)], 并呈典型的茶托形貌 [图 1(B)]. 此外, Western block 结果也证明该外泌体表面存在蛋白标志物 CD63 和 PD-L1 [图 1(C)].

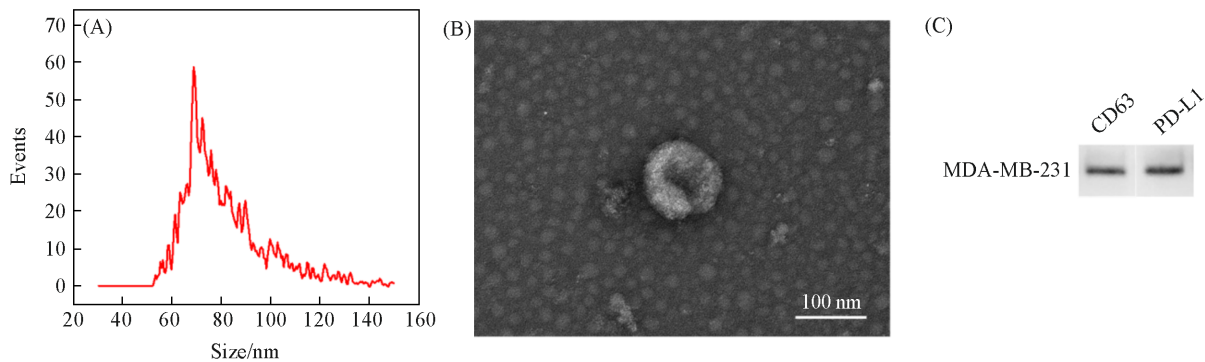


Fig. 1 Characterization of size(A), morphology(B) and surface markers(C) of PD-L1 positive exosomes

2.2 传感器的电化学表征

分别采用CV和EIS对传感器修饰的各步骤进行了表征. 以 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 作为探针, 采用CV研究了印迹膜制备过程中探针氧化电流的变化. 如图2(A)所示, 裸GCE显示出良好的氧化还原特性, 得到最大的电流响应信号(谱线*a*). 随后, 在裸GCE表面通过电聚合制备了一层致密且导电性差的GIP薄膜, 极大阻碍了探针向电极表面的扩散, 电流信号急剧减小(谱线*b*). 用1 mol/L的NaOH洗脱去除糖链后, GIP膜上形成印迹孔穴, 探针能够通过印迹孔穴扩散至GCE表面发生电化学反应, 因此电流信号回升(谱线*c*). 重吸附外泌体后, 印迹孔穴因被外泌体表面携带的糖链占据, 同时体积巨大的外泌体覆盖在电极表面, 探针的扩散再次被阻碍, 电流信号大幅减小(谱线*d*). 随后, 为排除游离蛋白的干扰而进行了裂解步骤(谱线*e*), 发现裂解后的信号与洗脱步骤后的信号几乎相同. 另一方面, 在nGIP膜的制备过程中[图2(B)], 在裸GCE(谱线*a'*)表面聚合形成了非分子印迹薄膜. 由于该致密且导电差的薄膜阻碍了探针扩散至电极表面参与电化学反应, 导致探针信号急剧降低(谱线*b'*). 接着, 在以1.0 mol/L NaOH进行洗脱(谱线*c'*)、重吸附外泌体(谱线*d'*)以及裂解外泌体(谱线*e'*)等过程中, 通过表征发现该聚合、洗脱、重吸附以及裂解过程中探针信号基本无变化, 这归因于nGIP的制备过程中未添加

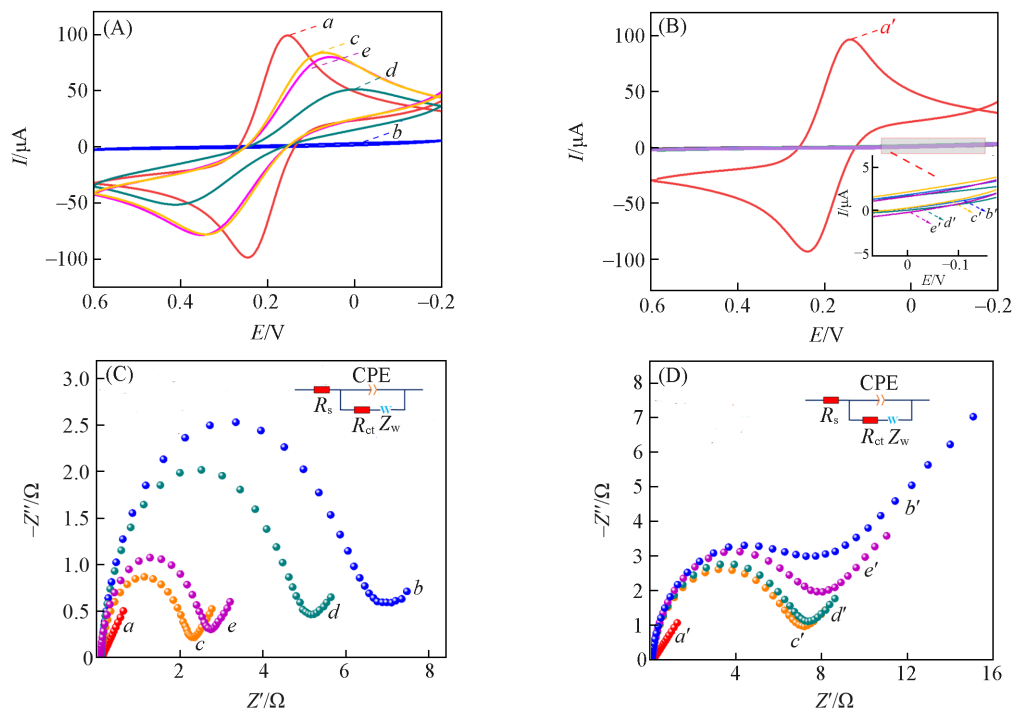


Fig. 2 CV responses of GIP(A) and nGIP(B) sensors and EIS characterization of GIP(C) and nGIP(D) sensor under different modification conditions

(A, C) *a*. Bare GCE, *b*. GIP, *c*. elution, *d*. rebound of exosomes, *e*. lysis of exosomes; (B, D) *a'*. bare GCE, *b'*. nGIP, *c'*. elution, *d'*. rebound of exosomes, *e'*. lysis of exosomes.

糖链, nGIP在洗脱后并无可识别糖链的印迹孔穴产生, 不能通过识别外泌体上的糖链而捕获外泌体. 同时, 也证明GIP能对外泌体糖链进行识别吸附.

通过EIS进一步研究了不同修饰条件下GCE与溶液间的界面性质和电荷转移的阻抗. 通过阻抗软件ZSimpWin获得了用于分析EIS结果的Randles等效电路和拟合能奎斯特图, 其中 R_s , CPE, R_{ct} 和 Z_w 分别为电解液电阻、恒定相角元件、电荷(电子)转移电阻和Warburg阻抗. Nyquist图中半圆的直径与 R_{ct} 相对应, R_{ct} 是决定铁氰化钾氧化还原探针电子转移动力学的关键参数. 结果如图2(C)所示, 在裸GCE表面(谱线*a*, 25 Ω)修饰一层致密且导电性差的GIP膜(谱线*b*, 6812 Ω), 薄膜的存在极大阻碍了探针扩散至在电极表面, 导致阻抗值骤然增大. 洗脱除去糖链后, 产生了大量可传递探针的印迹孔穴, 因此阻抗值降低(谱线*c*, 2108 Ω). 洗脱后的GIP修饰电极在重吸附识别浓度为 2.36×10^7 particles/mL的外泌体后, 印迹孔穴被重新占据, 再次阻碍了探针迁移到GCE表面的扩散过程, 阻抗值增大(谱线*d*, 4798 Ω). 最后, 在对重吸附的外泌体进行裂解后, 由于拥有大体积的外泌体被去除, 电极的有效面积增大, 阻抗值降低(谱线*e*, 2412 Ω). 以上结果表明, 制备的GIP传感器可识别并捕获携带糖链的外泌体. 作为对比, 对于nGIP传感器[图2(D)], 在裸GCE(谱线*a'*, 80 Ω)表面制备一层致密的nGIP膜后, 阻抗值增加至7293 Ω (谱线*b'*). 洗脱过程后阻抗值微降至6784 Ω (谱线*c'*), 两个值接近, 表明未形成印迹孔穴; 而重吸附糖链后(谱线*d'*, 7042 Ω)以及裂解过程(谱线*e'*, 7175 Ω)阻抗值也无明显差异, 进一步证明nGIP不能识别吸附特征糖链.

2.3 糖基印迹膜的表征

通过SEM研究了不同修饰过程所得GIP膜的表面形貌. 如图3所示, GCE表面聚合得到的GIP呈现平坦且致密的相貌[图3(A)]. 用NaOH洗脱去除糖链后形成了大量的微孔(推测为印迹孔穴), 使得印迹膜表面变得粗糙不平[图3(B)]. 当印迹膜吸附外泌体后, 可见尺寸约为50~150 nm的外泌体被固定于GIP膜表面[图3(C)], 表明GIP对外泌体具有识别及吸附作用. 另一方面, 糖链和外泌体均属于亲水性物质, 不同修饰步骤下的GIP膜表面会有亲水性的变化. 利用接触角测量仪研究了不同修饰步骤下GIP膜的亲疏水性. 如图3所示, GIP膜的接触角为 42.33° [图3(D)]. 当亲水性的糖链被洗脱去除后, GIP膜的亲水性下降, 接触角增大至 60.29° [图3(E)]. 而GIP膜重吸附外泌体后, 接触角降低至 25.80° [图3(F)], 这归因于肿瘤外泌体表面过量表达的亲水性糖基化特征, 增加了修饰电极表面的亲

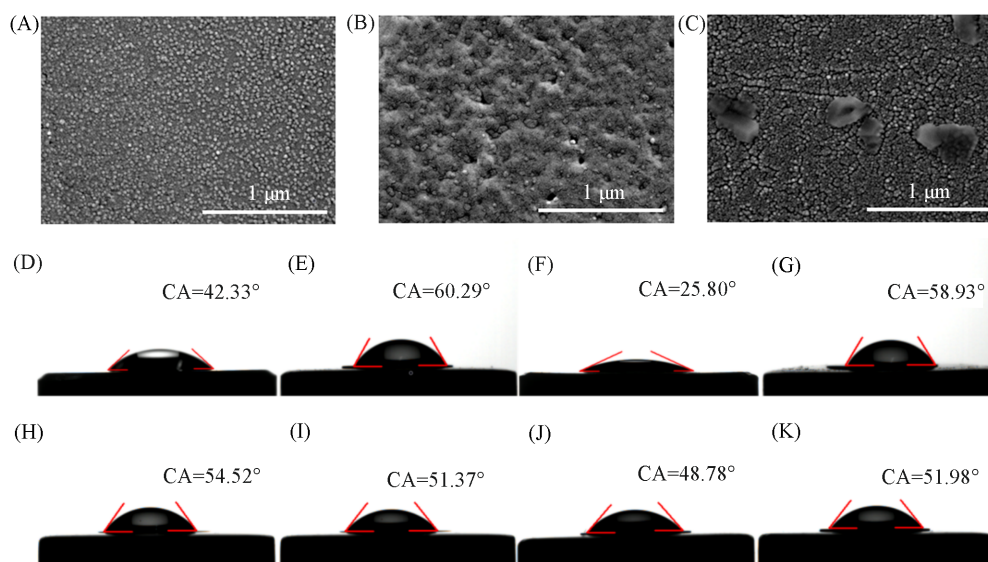


Fig. 3 SEM(A—C) and contact angle(D—K) characterizations of GIP membrane under different modification conditions

(A, D) GIP membrane; (B, E) GIP membrane after elution; (C) GIP membrane resorbing exosomes; (F) GIP membrane after rebound exosome; (G) GIP membrane after lysis of exosomes; (H) nGIP membrane; (I) nGIP membrane after elution; (J) nGIP membrane after rebound exosome; (K) nGIP membrane after lysis of exosomes.

水性. 采用RIPA裂解液裂解外泌体后, 携带大量亲水性糖基的外泌体被破坏, 亲水性再次显著降低, 接触角回升至 58.93° [图3(G)]. 与GIP膜相比较, nGIP膜[图3(H)]中不存在可洗脱去除的亲水性糖链, 接触角较大(54.52°). 由于洗脱后的nGIP膜不能形成识别糖基的印迹孔穴, 因此其洗脱步骤[图3(I)]、重吸附外泌体[图3(J)]以及裂解外泌体[图3(K)]等步骤对应的nGIP膜的亲水性基本无明显差异, 其接触角分别为 51.37° , 48.78° 及 51.98° . 上述结果表明, GIP膜能够特异性识别乳腺癌PD-L1阳性外泌体携带的特征糖链.

采用傅里叶变换红外光谱表征了GIP印迹膜洗脱前后的差异. 如图4(A)所示, 在GIP印迹膜洗脱前(谱线a)和洗脱后(谱线b)的红外光谱中, 1618和 1400 cm^{-1} 处的峰分别归属于3-氨基苯硼酸聚合物膜的氨基及B—O键特征峰. 洗脱前GIP膜 1262 cm^{-1} 处的峰归属于3-氨基苯硼酸与糖链之间形成的硼酸环状酯中B—O—C的特征峰; 950 和 827 cm^{-1} 处的峰归因于糖链中的糖苷键. 然而, 洗脱去除糖链后(谱线b), 分别归属于B—O—C的 1262 cm^{-1} 特征峰以及 950 和 827 cm^{-1} 处的糖苷键特征峰消失, 表明GIP膜中的硼酸环状酯结构被破坏, 即洗脱去除了糖链. 此外, 使用AFM表征了GCE表面修饰GIP膜的厚度, 约为 16.89 nm [图4(B)和(C)]. 以上结果表明, GIP印迹膜已成功制备.

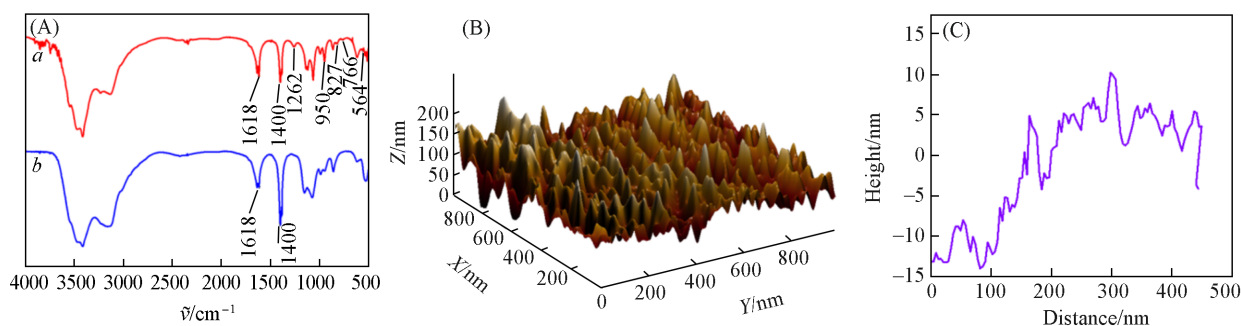


Fig. 4 FTIR characterization(A) of GIP membrane before and after elution, the thickness(B) and AFM cross section curve(C) of GIP membrane

2.4 实验条件的优化

2.4.1 电聚合循环圈数 印迹膜的厚度会影响印迹孔穴形成、重吸附过程及探针传质过程. 在含有糖链和功能单体3-氨基苯硼酸的 0.2 mol/L PBS缓冲溶液($\text{pH}=7.4$)中, 采用CV法在 $0\sim 1.0\text{ V}$ 的扫描窗口制备了GIP薄膜. 在聚合过程中, 糖链Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal含有的顺式二羟基结构可以与3-氨基苯硼酸在弱碱性条件下形成环状酯而被包埋印迹在聚合物中. 电聚合3-氨基苯硼酸属于不可逆过程, 如图5所示, 扫描第一圈时, 在 0.65 V 出现极大的氧化峰, 归因于氨基的聚合. 随着扫描圈数的增加, 氧化峰峰型逐渐消失, 在30圈氧化峰电流基本不发生变化, 表明一层致密且弱导电的GIP膜在裸GCE电极表面形成. 此条件下制备的GIP膜的洗脱及重吸附效果更好, 因此, 选择电聚合30圈为最优聚合条件.

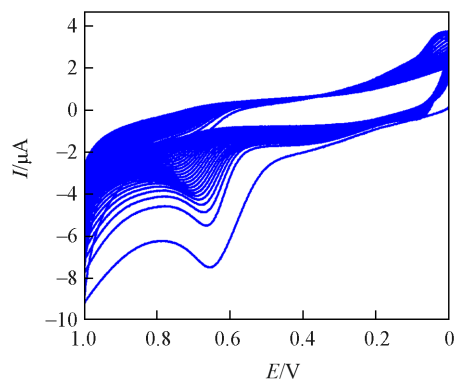


Fig. 5 Optimization of the number of electropolymerization cycles

2.4.2 洗脱及重吸附条件 为了获得稳定存在且可特异性识别肿瘤外泌体的印迹孔穴, 洗脱剂和洗脱时间是两个关键的影响因素. 在弱酸或强碱条件下, 硼酸亲和反应形成的环状酯结构会发生硼酸与顺式二羟基的解离. 因此, 分别选择洗脱剂甲醇/乙酸(体积比8:1)、乙醇/乙酸(体积比8:1)、甲醇/乙酸/PBS(体积比4:1:2)和 1.0 mol/L NaOH 用于洗脱去除GIP膜中吸附的糖链. 结果表明, 以 1.0 mol/L NaOH 作为洗脱剂时, 洗脱效果和重吸附性能较好. 因此, 后续洗脱时间的优化以 1.0 mol/L NaOH 为

最佳洗脱剂,以1 min为间隔记录洗脱后修饰电极的响应信号.如图6(A)所示,随着洗脱时间的增加,探针响应信号逐渐变大;当洗脱时间达6 min后逐渐稳定.因此,洗脱的最佳时间为6 min.为确保外泌体被GIP膜特异性识别并稳定地固定在薄膜上,研究了重吸附时间对识别效果的影响.在洗脱后的糖基印迹传感器上滴加 1.18×10^7 particles/mL的外泌体进行重吸附实验,以10 min为间隔测定并记录响应信号.如图6(B)所示,随着重吸附识别外泌体时间的增加,探针的响应信号值逐渐降低,最终在重吸附时间超过60 min后逐渐趋于稳定.因此,选择60 min为最优重吸附时间.

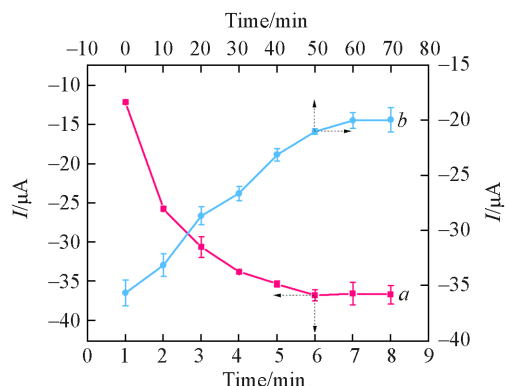


Fig. 6 Optimization of elution(a) and rebound(b) time

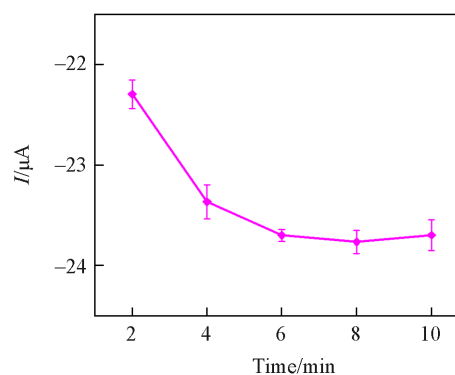


Fig. 7 Optimization of time for lysis of exosomes

2.4.3 裂解外泌体时间的影响 由于外泌体所在的介质环境复杂,可能存在游离蛋白干扰GIP对外泌体的识别与吸附.为了消除游离蛋白对外泌体定量分析的影响,采用RIPA裂解液对印迹膜表面重吸附的外泌体进行裂解,记录了裂解前后铁氰化钾探针的DPV氧化电流.为了确保GIP膜表面的外泌体被完全裂解,考察了裂解时间的影响.将重吸附识别外泌体的GIP传感器浸入RIPA/PBS(体积比1:1)裂解液中进行裂解,每隔2 min记录裂解后的响应信号.如图7所示,随着裂解的时间增加,探针的DPV氧化电流值在8 min后出现平台期.因此,选择8 min作为裂解时间.

2.5 GIP传感器分析不同浓度外泌体的电化学响应性能

在上述最佳实验条件下,考察了GIP传感器对不同浓度乳腺癌PD-L1阳性外泌体定量识别检测的性能.将GIP传感器置于不同浓度的PD-L1阳性外泌体中进行静态重吸附60 min,再以 5.0×10^{-3} mol/L $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 溶液为信号探针,采用DPV法分别测定重吸附外泌体(I_1)和裂解外泌体后(I_2)的响应信号,并以 $\Delta I = I_1 - I_2$ 绘制传感器定量不同浓度外泌体的工作曲线.结果表明,在 $2.36 \times 10^2 \sim 1.18 \times 10^7$ particles/mL浓度范围内,随着重吸附识别外泌体浓度的增大,探针的响应信号逐渐降低[图8(A)],而裂解后的响应信号仅有微小变化[图8(B)], ΔI 与外泌体浓度对数值($\lg c$)呈线性正相关关系

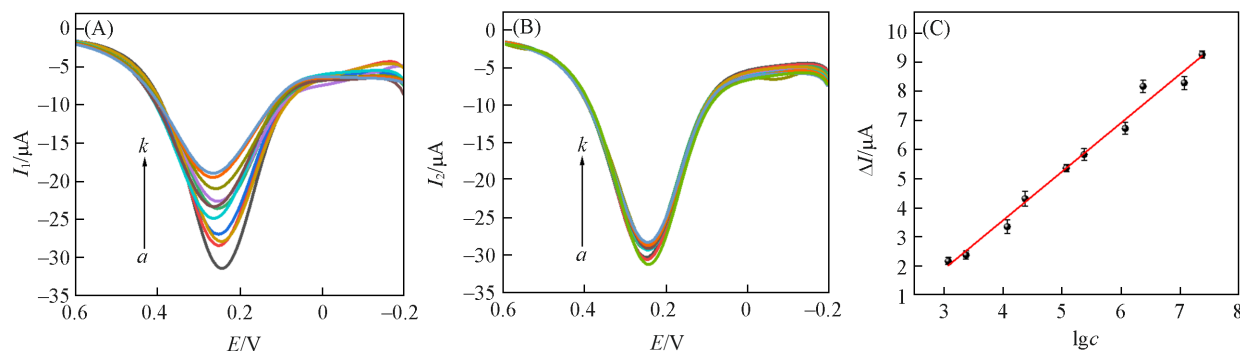


Fig. 8 DPV responses of GIP sensor to different concentrations of exosomes(A), DPV responses of GIP sensor after lysing different concentrations of exosomes(B), and calibration curve of GIP sensor for exosomes(C)

$a-k$, $c/(\text{particles} \cdot \text{mL}^{-1})$: 0, 2.36×10^2 , 1.18×10^3 , 2.36×10^3 , 1.18×10^4 , 2.36×10^4 , 1.18×10^5 , 2.36×10^5 , 1.18×10^6 , 2.36×10^6 , 1.18×10^7 .

[图8(C)], 线性方程为 $\Delta I = 1.67 \times 10^{-6} \lg c - 3.10 \times 10^{-6}$ ($r = 0.9964$), 检出限为 93 particles/mL. 通过与其它定量分析外泌体的方法(表1)对比发现, 本文制备的传感器具有良好的检出效果.

Table 1 Comparison of the GIP sensor with other reported detection methods

Method	Line range/(particles·mL ⁻¹)	LOD/(particles·mL ⁻¹)	Ref.
Electrochemical sensor	1.0×10 ³ —1.0×10 ¹⁰	3.34×10 ²	[27]
Surface plasmon resonance	1.0×10 ³ —1.0×10 ⁷	31.9	[28]
Chemiluminescence immunosensor	4.75×10 ³ —4.75×10 ⁸	7.76×10 ²	[29]
Electrochemical biosensor	1.2×10 ² —1.2×10 ⁷	38	[30]
Fluorescence aptasensor	5.0×10 ² —5.0×10 ⁹	13	[31]
GIP electrochemical sensor	2.36×10 ² —1.18×10 ⁷	93	This work

此外, 利用等温吸附法考察了 GIP 和 nGIP 传感器对外泌体的吸附性能, 结果如图9所示. 对于浓度范围为 0~2.36×10⁷ particles/mL 的外泌体, 随着浓度的增大, GIP 传感器比 nGIP 的信号变化值更明显, 最终达到饱和吸附后, $\Delta I_{\text{GIP}} = 9.33 \mu\text{A}$, $\Delta I_{\text{nGIP}} = 2.42 \mu\text{A}$. 根据印迹因子(IF)计算公式 $IF = \Delta I_{\text{GIP}} / \Delta I_{\text{nGIP}}$ 得到 GIP 传感器的印迹因子为 3.84.

2.6 GIP传感器的抗干扰性、重现性和稳定性

为了评估该传感器的抗干扰性能, 选择人体血液中常见的一系列共存物质, 如 C 反应蛋白(CRP, 1.0 $\mu\text{g/L}$)、葡萄糖(GLU, 1.0×10⁻⁶ mol/L)、癌胚抗原(CEA, 1.0 ng/mL)、CA724(50 U/mL)、心肌肌钙蛋白 I(CTnI, 1.0 $\mu\text{g/mL}$)、抗坏血酸(ASA, 1.0×10⁻⁶ mol/L)、白细胞介素-6(IL-6, 1.0 ng/mL)和甲胎蛋白(AFP, 1.0 $\mu\text{g/mL}$)作为干扰物, 同时选择 1.18×10⁷ particles/mL 外泌体的响应信号作为对比. 如图10(A)所示, GIP 传感器对上述干扰物的响应信号极小, 最大干扰信号仅占外泌体信号 5.36%, 混

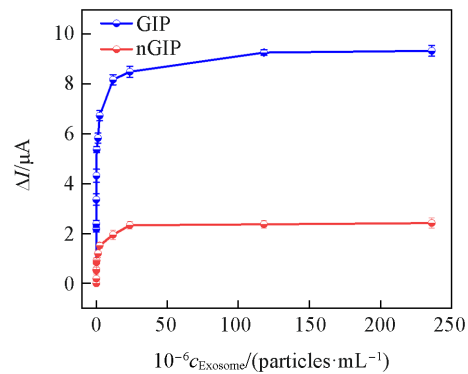


Fig. 9 Isothermal adsorption properties of GIP and nGIP sensors for different concentrations of exosomes

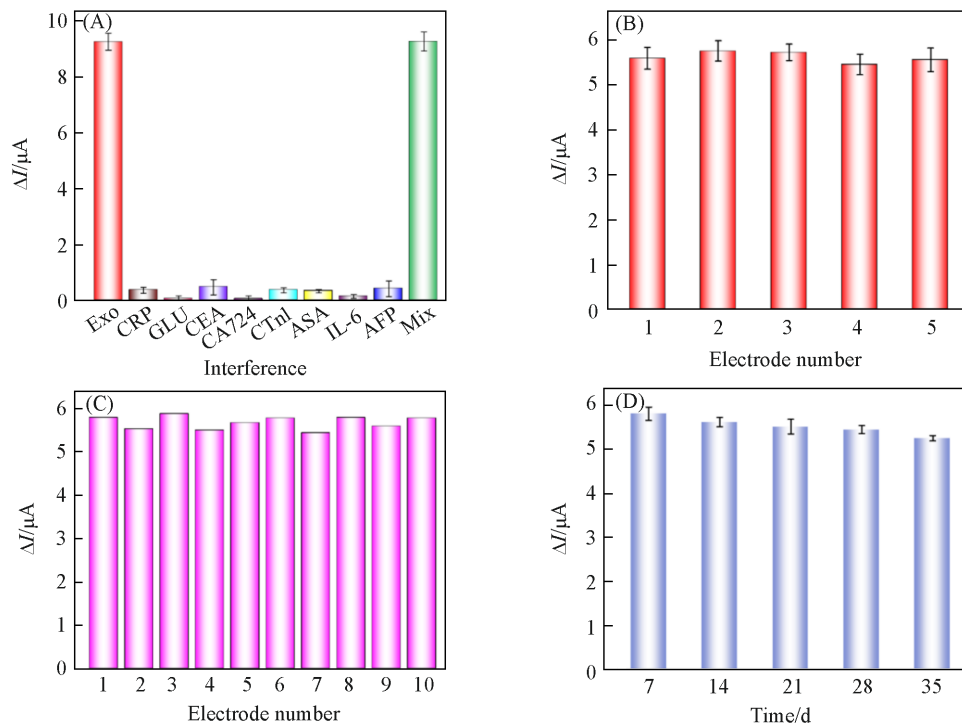


Fig. 10 Anti-interference(A), inter-batch (B) and intra-batch(C) reproducibility and stability(D) of the GIP sensor

合添加其它干扰物质后的外泌体信号误差仅有 3.02%。可见,该传感器在复杂介质环境中仍能准确定量检测外泌体。此外,分别考察了 GIP 传感器的重现性和稳定性。分别用 5 支裸 GCE 电极制备 GIP 传感器,用于研究传感器的重现性。将制备的印迹电极浸入浓度为 1.18×10^7 particles/mL 的外泌体中重吸附 60 min,分别测定裂解前后的 DPV 电流值的变化,5 支印迹电极的电流变化值的相对标准偏差(RSD)为 1.96% [图 10(B)]。另外,考察了同一支印迹电极连续测定的重现性。将印迹电极置于浓度为 1.18×10^5 particles/mL 的外泌体中重吸附 60 min,分别测定外泌体裂解前后的 DPV 响应信号的变化值,得到 RSD 为 2.52% ($n=10$) [图 10(C)]。以上实验结果表明 GIP 传感器具有良好的重现性。为考察传感器的稳定性,将制备的传感器放置于 4 °C 冰箱中,30 d 内不定时取出,于 1.18×10^5 particles/mL 的外泌体溶液中重吸附。结果表明 [图 10(D)],加 RIPA 裂解液前后 DPV 的 ΔI 无明显差异, GIP 传感器在 28 d 内仍能保持 93.8% 的信号变化值,说明该 GIP 传感器具有良好的稳定性。

2.7 传感器对不同来源外泌体的识别性能

不同来源的外泌体具有异质性,同时外泌体携带的糖基化程度也有差异,尤其在正常外泌体和肿瘤外泌体之间。因此,为了研究 GIP 传感器识别不同来源外泌体的性能,分别考察了传感器对正常细胞外泌体 MCF-10A (5.94×10^7 particles/mL)、乳腺癌 PD-L1 阳性外泌体来源包括 MCF-7 (2.78×10^6 particles/mL) 以及 MDA-MB-231 (1.18×10^7 particles/mL) 细胞系的信号响应。结果如图 11 所示, GIP 传感器对于 MCF-7 及 MDA-MB-231 的响应信号远高于 MCF-10A,这归因于乳腺癌阳性外泌体含有更多的 PD-L1 并有特征糖基化表达,进而更有利于 GIP 传感器对乳腺癌阳性 PD-L1 外泌体的识别和捕获。可见,该 GIP 传感器可用于乳腺癌来源外泌体和正常外泌体的初步鉴定。

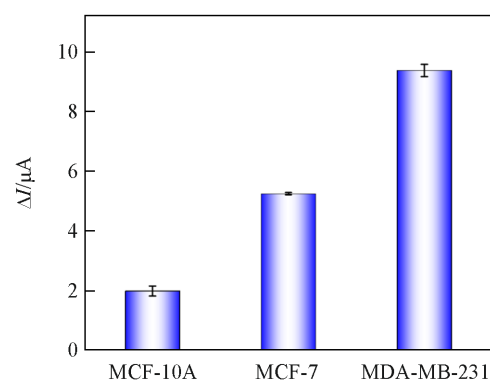


Fig. 11 Recognition performance of GIP sensor for exosomes from different sources

2.8 临床样品分析

为了考察 GIP 传感器应用于肿瘤筛查的潜力,将 GIP 传感器用于临床血清样品外泌体的测定。血清样品包含健康个体(Health)和乳腺癌(BC)患者,均采集于桂林医学院提取的志愿者样本。在制备的 GIP 电极膜上滴加 10 μ L 血清样品中进行重吸附 60 min 后,按照实验方法分别测量裂解外泌体前后的 DPV 值。采用加标回收法评价测定结果的准确性,结果如表 2 所示。临床血清样本的回收率在 93.82%~105.32% 之间,表明该传感器可用于乳腺癌的临床样品检测。

Table 2 Analytical performance of the GIP sensor in clinical samples

Sample	Found/(particles \cdot mL ⁻¹)	RSD($n=5$, %)	Added/(particles \cdot mL ⁻¹)	Total found/(particles \cdot mL ⁻¹)	RSD($n=5$, %)	Recovery(%)
Health 1	3.35×10^4	2.60	1.18×10^4	4.25×10^4	4.29	93.82
Health 2	6.71×10^4	3.49	2.36×10^4	9.03×10^4	2.88	99.56
BC 1	1.06×10^6	4.23	2.36×10^6	3.43×10^6	2.77	100.29
BC 2	5.35×10^6	3.54	2.36×10^6	8.12×10^6	4.43	105.32

3 结 论

构建了一种糖基印迹电化学传感器用于乳腺癌 PD-L1 阳性外泌体的快速检测。该传感器基于乳腺癌外泌体表面蛋白 PD-L1 的糖基化结构来捕获和特异性识别乳腺癌 PD-L1 阳性外泌体;再利用“门控制效应”进行外泌体的快速定量分析。将该传感器用于正常和乳腺癌阳性个体血液样品中 PD-L1 外泌体的分析,结果证明二者的 PD-L1 外泌体数有显著差异,表明该传感器可用于临床乳腺癌的早期筛查。

参 考 文 献

- [1] Bray F., Laversanne M., Sung H., Ferlay J., Siegel R. L., Soerjomataram I., Jemal A., *CA Cancer J. Clin.*, **2024**, 74(3), 229—263
- [2] Xu Y. Y., Gong M. Y., Wang Y., Yang Y., Liu S., Zeng Q. B., *Sci. Data*, **2023**, 10(1), 334
- [3] McDonald E. S., Clark A. S., Tchou J., Zhang P., Freedman G. M. J., *Nucl. Med.*, **2016**, 57, 9S—16S
- [4] Bevers T. B., Helvie M., Bonaccio E., Calhoun K. E., Daly M. B., Farrar W. B., Garber J. E., Gary R., Greenberg C. C., Greenup R., Hansen N. M., Harris R. E., Heerdt A. S., Helsten T., Hodgkiss L., Hoyt T. L., Huff J. G., Jacobs L., Lehman C. D., Monsees B., Niell B. L., Parker C. C., Pearlman M., Philpotts L., Shepardson L. B., Smith M. L., Stein M., Tumyan L., Williams C., Bergman M. A., Kumar R. J., *Natl. Compr. Canc. Netw.*, **2018**, 16(11), 1362—1389
- [5] Jeong S., Park M. J., Song W., Kim H. S., *Clin. Biochem.*, **2020**, 78, 43—57
- [6] Yu W., Hurley J., Roberts D., Chakraborty S. K., Enderle D., Noerholm M., Berakefield X. O., Skog J. K., *Ann. Oncol.*, **2021**, 32(4), 466—477
- [7] Jabbari N., Akbariazar E., Feqghi M., Rahbarghazi R., Rezaie J. J., *Cell. Physiol.*, **2020**, 235(10), 6345—6356
- [8] Xu R., Rai A., Chen M., Suwakulsiri W., Greening D. W., Simpson R. J., *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **2018**, 15(10), 617—638
- [9] Tang M. K. S., Wong A. S., *Cancer Lett.*, **2015**, 367(1), 26—33
- [10] Jenjaroenpun P., Kremenska Y., Nair V. M., Kremenskoy M., Joseph B., Kurochkin I. V., *PeerJ*, **2013**, 1, e201
- [11] Fan W. J., Han P. H., Feng Q. Y., Sun Y. Y., Ren W., Lawson T., Liu C. H., *Anal. Chem.*, **2022**, 94(4), 2172—2179
- [12] Yu Z. Q., Yang Y., Fang W. M., Hu P., Liu Y. B., Shi J. L., *ACS Nano*, **2023**, 17(12), 11384—11395
- [13] Li C. W., Lim S. O., Chung E. M., Kim Y. S., Park A. H., Yao J., Cha J. H., Xia W. Y., Chan L. C., Kim T., Chang S. S., Lee H. H., Chou C. K., Liu Y. L., Yeh H. C., Perillo E. P., Dunn A. K., Kuo C. W., Khoo K. H., Hsu J. L., Wu Y., Hsu J. M., Yamaguchi H., Huang T. H., Sahin A. A., Hortobagyi G. N., Yoo S. S., Hung M. C., *Cancer Cell*, **2018**, 33(2), 187—201. e10
- [14] Benicky J., Sanda M., Brnakova Kennedy Z., Grant O. C., Woods R. J., Zwart A., Goldman R. J., *Proteome Res.*, **2020**, 20(1), 485—497
- [15] Li C. W., Lim S. O., Xia W. Y., Lee H. H., Chan L. C., Kuo C. W., Khoo K. H., Chang S. S., Cha J. H., Kim T., Hsu J. L., Wu Y., Hsu J. M., Yamaguchi H., Ding Q. Q., Wang Y., Yao J., Lee C. C., Wu H. J., Sahin A. A., Yu D. H., Hortobagyi G. N., Hung M. C., *Nat. Commun.*, **2016**, 7(1), 12632
- [16] Zhu L., Sun H. T., Wang S., Huang S. L., Zheng Y., Wang C. Q., Hu B. Y., Qin W., Zou T. T., Fu Y., Shen X. T., Zhu W. W., Geng Y., Lu L., Jia H. L., Qin L. X., Dong Q. Z., *J. Hematol. Oncol.*, **2020**, 13, 1—24
- [17] Zhang M. D., Jin K., Gao L., Zhang Z. K., Li F., Zhou F. F., Zhang L., *Small Methods*, **2018**, 2(9), 1800021
- [18] Hu J. J., Mao Z. H., Lu Y. K., Chen Q., Xia J. J., Deng H., Chen H. X., *Biosens. Bioelectron.*, **2023**, 235, 115379
- [19] Zhang X. Y., Zhu X. Y., Li Y. F., Hai X., Bi S., *Talanta*, **2023**, 258, 124456
- [20] Zhou J. Q., Lin Q. Y., Huang Z. P., Xiong H. W., Yang B., Chen H., Kong J. L., *Anal. Chem.*, **2022**, 94(15), 5723—5728
- [21] Diao X. K., Li X. L., Hou S. P., Li H. J., Qi G. H., Jin Y. D., *Anal. Chem.*, **2023**, 95(19), 7552—7559
- [22] Wu L. C., Li X. L., Miao H. H., Xu J. J., Pan G. Q., *View*, **2022**, 3(3), 20200170
- [23] Mazzotta E., Di Giulio T., Malitesta C., *Anal. Bioanal. Chem.*, **2022**, 414(18), 5165—5200
- [24] Jiang Z. J., Luo K., Zeng H. H., Li J. P., *ACS Sens.*, **2024**, 9(3), 1252—1260
- [25] Li J. P., Ma X. H., Li M. X., Zhang Y., *Biosens. Bioelectron.*, **2018**, 99, 438—442
- [26] Li P. F., Liu Z., *Chem. Soc. Rev.*, **2024**, 53, 1870—1891
- [27] Cao Y., Wang Y., Yu X. M., Jiang X. H., Li G., Zhao J., *Biosens. Bioelectron.*, **2020**, 166, 112452
- [28] Liu H. Z., Zhou Y. Y., Chang W. W., Zhao X. L., Hu X. J., Koh K., Chen H. X., *Biosens. Bioelectron.*, **2024**, 262, 116527
- [29] Wang M. L., Shu J. N., Wang Y. S., Zhang W. C., Zheng K. Y., Zhou S. N., Yang D. L., Cui H., *ACS Sens.*, **2024**, 9(6), 3444—3454
- [30] Wang M. H., Lin Y. X., Wu S., Deng Y., Zhang Y. Y., Yang J., Li G. X., *Sens. Actuators, B*, **2022**, 362, 131813
- [31] Zhu N. N., Li G. H., Zhou J., Kang K., Ying B. W., Yi Q. Y., Wu Y. J., *Mater. Chem.*, **2021**, 9(10), 2483—2493

(Ed.: N, K)