

生物传感器在蛋白质检测实验教学中的应用

高力¹ 吕秋香¹ 李琴¹ 邓易习¹ 时海霞^{2*}

1. 江苏大学 生命科学学院 江苏 镇江 212013;

2. 江苏大学 体育部 江苏 镇江 212013

[摘要]生物学实验一门以实验为基础的学科,但目前生物学实验存在实验条件简陋、缺少交叉学科知识、实验技术缺乏革新等问题。为实现这一目标,我们在生物实验教学过程中引入一种石墨烯氧化物为基础的生物传感器,并以疾病的蛋白质标志物的检测作为实验教学实例,提高学生的实际动手操作能力及观察分析问题的能力,达到提高实验教学的目的,从而为生物实验教学提供新思路。

[关键词]生物传感器;蛋白质检测;实验教学

【DOI】10.12252/j.issn.2096-6288.2020.03.582

生物学是一门以观察、比较和实验为基本研究方法的学科,实验对生物学理论的建立,科学理论和方法的获得以及学生的培养具有较为重要的作用。通过实验可以培养学生的兴趣,激发学生学习的热情,加深对生物学理论的理解,实验教学加强学生的实验操作的规范性训练,强化学生实验技能,提高学生的实验综合素质,并在实际生物学研究中应用。所以做为生物学的教师应该创造实验条件、探索新的实验技能,革新现有实验方法,积极培养学生的实验兴趣。

1 现有生物实验教学中存在的问题

1.1 实验条件简陋、缺少实际操作机会,实验教学考核方式落后

生物学实验教学涉及的仪器设备较多、成本较高,但在实验教学方面的资金投入方面,无论是中学还是大学都较为有限,一些实验室尤其中学生物学实验室缺乏相应的设备,几十个学生共用1台仪器,有的学生连操作的机会也没有。没有实际操作生物学实验,对实验的原理,具体操作步骤很难有深刻的认识,更谈不上掌握实验技能。出现学生对实验原理不了解,对实验结果不清晰,这使得学生缺乏积极性与主动性,以致对实验的关键点把握不好,有必要采用相对简单的实验来进行教学。目前实验教学考核主要以实验报告的质量进行评价和考核,这种考核方式使得学生认为只要实验报告写的详细,讨论深刻就能达到实验教学目的,这会形成“纸上谈兵”的考核模式,难以真正培养学生的实验技能,忽视实验是否与实践相结合、动手能力是否提高等问题。

1.2 注重实验结果,缺乏交叉学科知识,不能有效培养学生实验技能

21世纪的今天,学校教学的重点是学生核心素养的培养,新实验课程的改革需要跟随时代潮流,正变得更加注重培养创新思维和实践能力,因此实验的结构和内容也需要发生改变^[1]。在生物学实验方面,学生对现有实验过程中的变化没有进行较好的分析,对实验出现的问题,没有进行较好的解决,对基本实验操作技能没有进行较好的训练,比如有的学生在配置生物试剂的时候,没有混匀,就进行实验,或者在配置试剂的时候,在量筒内没有任何溶液的情况下,倒入粉末状的试剂,造成溶解的不均匀或使试剂粘成一团。这些表明学生缺乏基本的实验训练,为加强学生的实验技能,有必要采用多学科交叉的实验来培养学生的基本技能,增强实验知识,拓宽视野。

1.3 实验时间过长,难以用于课堂教学,难以调动学生积极性

现阶段课堂教学所涉及到的部分实验过程较长,如高效液相色谱分离柱的使用,在短时间内效果根本不能完成,类似这种情况一般的解决办法是课上先完成一部分,余下的学生轮流进行试验,各自再完成整体实验的一部分。这样长

时段的实验难以用于课堂教学。其次,部分生物学实验所需的试剂复杂多样,影响因素较多,如温度、湿度、光照等,但该过程常由老师在课前完成,学生只需按规定完成实验报告即可,该种方式会对让学生产生惰性思维,学生除了疲惫外,感觉不到取得成果的乐趣,这样会促使实验教学的意义大打折扣。因此,实验过程较为关键的步骤,应让学生参与完成。

1.4 实验技术缺乏革新、难以跟随时代潮流

目前生物学实验教育呈现基础知识扎实,创新能力不足的现状,因此,培养创新型人才是新时期教育的核心要求。生物学实验教学存在部分内容没有更新,与理论教学脱节的现象,这阻碍实验教学的发展,与当前的生命科学发展的形式不协调。目前常用的蛋白质浓度测定方法,比如Folin-酚法是双缩脲法的发展,反应的第一步涉及碱性溶液中铜-蛋白质复合物的形成,然后这个复合物去还原钼酸-磷酸试剂(Folin试剂),产生深蓝色(钼蓝和钨蓝混合物)缺点是费时间较长,要精确控制操作时间,标准曲线也不是严格的直线形式,且专一性较差,干扰物质较多。还有由于各种蛋白质中的精氨酸和芳香族氨基酸的含量不同,因此考马斯蓝染色法用于不同蛋白质测定时如线性关系不很好,有较大的偏差。这些实验方法是几十年前发展的,在科学日益发展的今天,需要改进和提高。更关键的是这些方法,缺少针对某一种疾病相关的蛋白质特异性的检测,无法定性,在实际检测中无法具体应用。

针对上述问题,有必要发展简单易行的实验用于教学,让学生深刻理解科学的奥秘。生物传感器是一种对生物物质敏感并将其浓度转换为电信号进行检测的仪器,能解决上述存在的问题,让学生了解生物传感器的原理,比如把光学信号转换成电信号,并把这些信号转换成可以测量的信号,把信号转换成便于观察、便于理解的形式^[2]。

2 生物传感器的优点和应用实例

生物传感器属于多学科交叉渗透课程涉及磁学、光学、电学、化学等学科^[3],是由固定化的生物敏感材料作识别元件、理化换能器及信号放大装置构成的分析系统。

2.1 优点

生物传感器费用和成本低;专一性好,只对特定的底物起反应,因此一般不需要进行样品的预处理,干扰少;分析速度快;准确性高、操作系统简单、容易实现自动化分析。

2.2 生物传感器应用实例

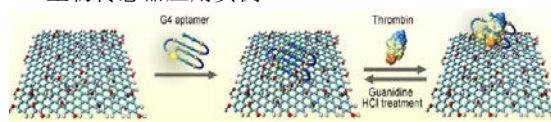


图1 基于GO-DNA传感器对凝血酶的检测^[3]

实验原理：核酸适配体是一类能特异识别细胞膜表面受体蛋白的寡核苷酸，相较于蛋白抗体，核酸适配体具有分子量小、易于修饰改造，制备工艺简单等优点。石墨烯氧化物(GO)表面能吸附荧光标记的核酸适配体基于荧光共振能量转移(FRET)淬灭荧光，当目标物结合核酸适配体后，核酸适配体脱离GO表面而发光，通过荧光强度的变化，实现对目标物的检测(图1)。凝血酶的浓度与凝血异常现象相关，凝血异常现象与各种疾病的发展密切相关，例如阿尔兹海默症和癌症，所以被认为是一种疾病的标志物^[4]。

实验所需的化学试剂和仪器：酶标仪、石墨烯氧化物、凝血酶、核酸适配体等，数据由Origin软件进行分析。

2.2.1 石墨烯氧化物的浓度优化

双击Origin 8快捷键，打开软件。文件→New，选中选项卡里的Project，单击OK按钮，新的工作界面建立。把使用酶标仪所测得的荧光强度数据填入上述工作表格，能获得相应的荧光曲线图。不同浓度的GO对荧光淬灭效果不同，在本实验中，用20nM FAM-修饰的核酸适配体溶液，加入到不同浓度的GO，反应30min，核酸适配体的荧光强度在40 μg/mL GO下，荧光强度趋近于最小值，淬灭率达90%。

2.2.2 动力学分析

如图2展示了在不同反应时间下荧光强度的变化，当核酸适配体与GO反应5 min时，荧光强度快速降速，30 min后趋于稳定。当加入凝血酶后，从图中红色曲线可知，凝血酶与GO上核酸适配体反应，使核酸适配体脱离GO表面所需要的时间，相对较长，但在反应30 min后也趋于稳定。

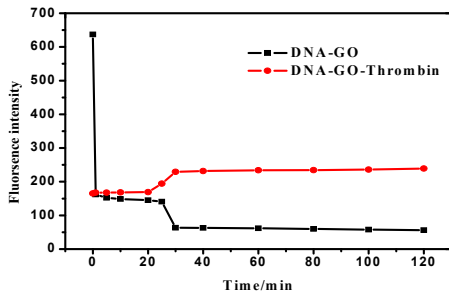


图2 荧光修饰的核酸适配体在不同情况下的荧光强度^{[3] (P19)}

2.2.3 凝血酶高灵敏度检测分析

20nM核酸适配体与40 μg/mL GO反应30min，加入不同浓度(0-60 nM)的凝血酶反应30min，结果如图3所示，核酸适配体的荧光信号被淬灭后，特异性地与凝血酶反应后，核酸适配体脱离GO表面，荧光强度出现回升。

灵敏性检测结果所需图形为线性拟合结果图，在Origin软件中，在菜单栏中点击“分析”-“Fitting”-“Fit Linear”，再单击OK按钮，即可得到的A(X)与B(Y)的线性方程为 $y=0.0833x+0.2519$ ， $R^2=0.9923$ (图4)。

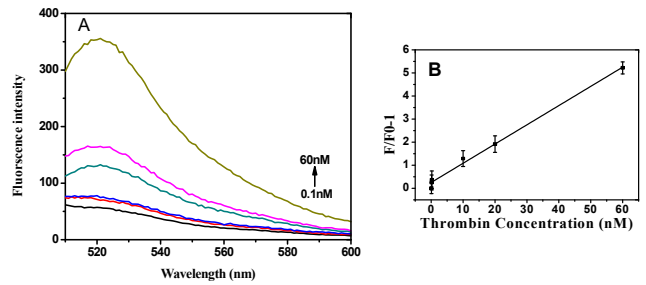


图4 (A) GO-DNA传感器加入不同浓度的凝血酶后的荧光强度。(B)插图是实验中加入不同浓度的凝血酶后 F/F_0-1 的值。 F 和 F_0 分别是未加入凝血酶和加入凝血酶的荧光强度^{[3] (P20)}。

最后，基于3N/S算出凝血酶的检测限(LOD)，所得 $LOD=0.051nM$ 。所谓检测限，即在样品中能检出的被测组分的最低浓度(量)称为检测限，即产生信号(峰高)为基线噪音标准差k倍时的样品浓度，一般为信噪比(S/N) 2: 1或3: 1时的浓度，对其测定的准确度和精密性没有确定的要求。目前，一般将检测限定义为信噪比(S/N) 3: 1时的浓度，即

$$LOD = \frac{3S}{N}$$

(S: 11次空白平均值; N: 最小回复值-淬灭值/所用样品浓度)

3 结束语

科研服务教学，科学研究成果直接应用于实验教学。通过上述检测实例，把简单易学的生物传感器应用到实际的生物学实验教学中，注重基本理论与应用相结合。对由于生物传感器采用化学、生物、光学等交叉学科知识，激发学生的学习兴趣，提高学生的动手能力和专业技能，有利于拓宽学生的思路，让学生深刻体会科学的乐趣，开阔实验视野，掌握交叉学科知识理论。在实验课前，教师可以自行录制操作视频，要求学生在实验课前反复观看，帮助学生更好的理解实验流程，加深了对知识的理解，从而提高教学效率和效果。除了实验教学外，还可以给出若干个设计题目，让学生通过查阅课外资料和文献，根据所学内容发挥自己的能力进行实验设计，通过实践，学生锻炼了分析和解决问题的能力，培养学生实验动手能力、理论联系实际能力、探索创新能力，提高综合和总结的能力，从而培养科学、严谨的科研精神，培养创新性高的高素质人才。

参考文献

- [1]王艳华, 姜岩, 郭婷婷, 刘佳. 基于虚拟现实技术的实验教学CNKI论文分析[J]. 基础医学教育. 2018, 20(5): 414-419.
- [2]王正兴 贾磊. 《生物医学传感器》课程教学改革探索[J]. 现代交际, 2017, 17: 176.
- [3]徐莹, 薛凌云, 祝磊. 面向生物医学工程系的《测试技术与传感器》课程模式改革[J]. 教育教学论坛, 2015, 12(49): 131-132.
- [4]李琴. 基于石墨烯氧化物-DNA传感器对凝血酶高灵敏度检测的研究[M]. 江苏大学(硕士学位论文), 2016.

作者简介:

高力, 博士, 副教授, 主要进行生物传感器方面的研究, 江苏大学, 212013

时海霞, 博士, 副教授, 主要进行教育学方面的研究, 江苏大学, 212013

项目: 该论文受到江苏省高校哲学社会科学项目的资助(2018SJA1056)。

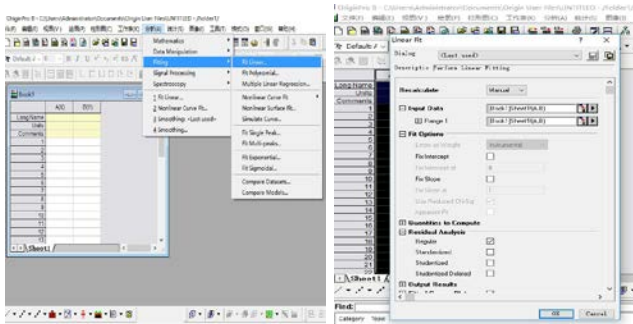


图3 线性拟合图