论著

文章编号:1000-5404(2009)12-1158-03

压电免疫传感器阵列检测尖吻蝮蛇毒的初步研究

刘明华[1],姚 婕[2],向 强[1],张 波[2],府伟灵[2] (第三军医大学西南医院:[1]急救部;[2]检验科,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨以压电传感阵列技术检测尖吻蝮蛇毒的可行性。**方法** 构建2×5的AT切向、基频10 MHz的石英晶体微阵列,将尖吻蝮蛇毒抗体巯基化,通过自组装技术固定在石英晶体金膜电极表面,检测不同浓度的尖吻蝮蛇毒标准液。**结果** 尖吻蝮蛇毒压电免疫传感器阵列上,最适抗体固定浓度为3 μg/ml,尖吻蝮蛇毒与相应抗体反应时间为40 min,检测尖吻蝮蛇毒最低浓度为0.1 μg/ml,蛇毒浓度在0.1~4.0 μg/ml范围时,与晶体频率变化之间呈良好的线性关系。**结论** 采用压电免疫传感器阵列检测尖吻蝮蛇毒响应特性良好,具有灵敏度高、操作简单、不需标记等优点,是实现快速仪器化检测蛇伤的可能途径。

关键词: 压电;免疫传感器;阵列;蛇毒;尖吻蝮毒蛇
中图法分类号: R312;R446.69;R996.3 **文献标识码:** A

Study on piezoelectric quartz crystal microarray immunosensor for the detection of Agkistrodon acutus venom

LIU Ming-hua[1], YAO Jie[2], XIANG Qiang[1], ZHANG Bo[2], FU Wei-ling[2] ([1]Department of Emergency, [2]Department of Laboratory Medicine, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the possibility of piezoelectric microarray immunosensor for the detection of Agkistrodon acutus venom. **Methods** Microarray immunosensor with quartz crystal of 10 MHz AT-cut and 2×5 gold-coated electrodes was prepared. The thiol-treated venom antibody was immobilized by a self assembling device for the detection of the standard fluid for different concentrations of the venom. **Results** Experimental results showed that the optimal concentration of the antibody was 3.0 g/ml with the response time of 40 minutes. The piezoelectric immunosensor could well respond to homologous venoms. Within the range of 0.1~4.0 g/ml, the frequency shifts were linearly dependent on the venom concentration. **Conclusion** Piezoelectric microarray immunosensor for the detection of Agkistrodon acutus venom is of high specificity of response, high sensitivity, and simple operation without marking. The technique of piezoelectric microarray immunosensor is possible to test snakebite quickly, quantitatively, and instrumentally.

Key words: piezoelectric; immunosensor; array; venom; Agkistrodon acutus

毒蛇伤害是一种严重威胁野外活动人员生命安全的常见伤害,发病急,变化快,并发症多,临床治疗较为棘手,尤其是对并发多脏器功能衰竭者治疗更为困难[1-3]。临床上蛇伤种类诊断不明往往是造成治疗盲目甚至延误治疗时机的重要因素。抗蛇毒血清是目前治疗蛇毒伤的特效药,但若蛇伤种类不明,就很难针对性应用抗蛇毒血清。现有临床检测蛇毒方法均存在一定的缺陷[4-7]。压电石英晶体免疫传感器是近年发展起来的一种新型生物传感器,原理主要基于其压电晶体的质量效应,即晶体谐振频率变化值(△f)与其表面质量负荷(△M)呈一定函数关系。本研究应用压电晶体传感器的原理,结合金膜电极表面自组装技术,构建了压电石英晶体尖吻蝮蛇毒免疫传感器阵列,在检测蛇毒方面进行了初步探讨。

1 材料与方法

1.1 传感器阵列制备与相关仪器

在刻蚀有2×5个孔的印刷电路板上,各孔分别镶嵌压电晶片。压电晶体为AT切型,双面镀金,基本频率为10 MHz,晶片直径8.0 cm,金膜电极直径4.5 cm。晶体两面的金膜电极接点与预埋电路的接点连接,制成2×5型石英晶体微阵列,每个

基金项目:重庆市自然科学基金(2007BB5037);第三军医大学西南医院军事医学创新基金(SWH2006B015)
Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (2007BB5037) and the Military Medical Innovation Foundation of Southwest Hospital of Third Military Medical University(2006B015)

作者简介:刘明华,男,湖北省仙桃市人,博士,主任医师,教授,主要从事蛇伤早期诊断与治疗方面的研究,发表论文20余篇。电话:(023)68754106,E-mail:jjbicu@sohu.com

收稿日期:2009-01-15;修回日期:2009-03-23

检测池的容积为 150 μl。各检测池编号依次为 1、2、…10。1 号检测池作气相对照,2 号检测池作液相对照。频率检测仪采用自激式振荡电路,多通道检测,频率信号为 TTL 电平输出,检测室具有恒温、屏蔽、防震等装置。ACL28454 多功能频率计数卡(ANDLINK 公司产品)内置于计算机。通过 PESA 分析软件 4.0 采集显示晶体频率计数、晶体频率变化值(△f)、频率变化趋势图,并进行储存和综合分析。

1.2　主要试剂

精制抗尖吻蝮蛇毒血清(上海生物制品研究所);精制尖吻蝮蛇毒(江西鹰潭蛇场),Sulfosuccinimidyl-6-[3'-(2-pyridyldithio) propionamido] hexanoate (Sulfo-LC-SPDP, Pierce 公司),6-巯基己醇(Aldrich 公司),Tris-HCl 缓冲液(10 μmol/L, pH = 7.9,含 NaCl 0.2 mol/L),去离子水,丙酮溶液,二硫苏糖醇,其余试剂均为分析纯。

1.3　方法

1.3.1　石英晶体的预处理　　各检测池金膜以丙酮、去离子水清洗 3 次,氮气吹干,将传感器阵列与电路系统相连接,气相中频率稳定后,在 2 ~ 10 号检测池各加入 Tris-HCl 缓冲液 90 μl,测定频率稳定后备用。

1.3.2　抗蛇毒抗体的巯基化处理　　抗尖吻蝮蛇毒抗体溶液 30 μl 与等体积的 Sulfo-LC-SPDP 溶液混合,室温反应 60 min,然后加入 25 mmol/L 的二硫苏糖醇 20 μl,混匀后室温反应 30 min。

1.3.3　抗蛇毒抗体分子定向自组装及最适浓度观察　　3 ~ 10 号检测池依次加入巯基化抗体溶液 10 μl(浓度分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0 μg/ml),固定 1 h。而后在 3 ~ 10 号检测池中加入 1.0 mmol/L 的 6-巯基己醇 10 μl,封闭 1 h。重复以上操作 6 次,取各浓度点固定前后晶体频率变化均值,制作曲线,求得最适浓度。

1.3.4　压电石英晶体免疫微阵列传感器检测方法的敏感性及标准曲线制作　　按前述方法于 3 ~ 10 号检测池固定最适浓度抗体。去离子水清洗各检测池,氮气吹干,2 ~ 10 号加入 PBS 液 70 μl,频率稳定后,4 ~ 10 号检测池加入 0.01、0.1、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 μg/ml 蛇毒标准溶液 10 μl(3 号作参比检测池),37 ℃观察 60 min。每个浓度点重复 6 次,取各浓度点反应前后频率变化均值,并制作曲线。

1.4　统计学方法

抗体固定及检测蛇毒液时引起的频率变化均值(计量资料)均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行 t 检验。

2　结果

2.1　巯基化抗体固定的量与抗体浓度之间的关系

抗体因巯基与金膜电极表面的金原子连接而被固定在金膜电极表面,其固定量以抗体固定前后晶体频率的减少 Δf 表示。实验证明固定抗体的量与抗体浓度密切相关,见图 1。从图 1 中可以看出,当抗体浓度小于 3.0 μg/ml 时,抗体固定量随浓度的增加而增大,抗体浓度达到 3.0 μg/ml 时,抗体的固定量达到饱和。因此本实验中抗体浓度选择 3.0 μg/ml。

2.2　抗原抗体反应时间对晶体振荡频率的影响

用制备好的石英晶体微阵列检测蛇毒标准品,在 37 ℃条件下观察随抗原抗体反应时间变化所对应的晶体频率变化值。结果显示,抗原抗体反应在 40 min 后,频率已不再降低,表明抗原抗体反应已达到平衡,免疫反应基本完成,再延长反应时间,晶体频率也无明显变化,见图 2。因此,本实验选择 40 min 作为蛇毒样品的检测观察时间。

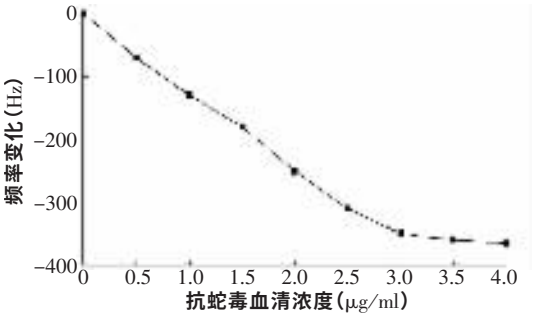


图 1　抗蛇毒血清浓度与晶体频率变化关系

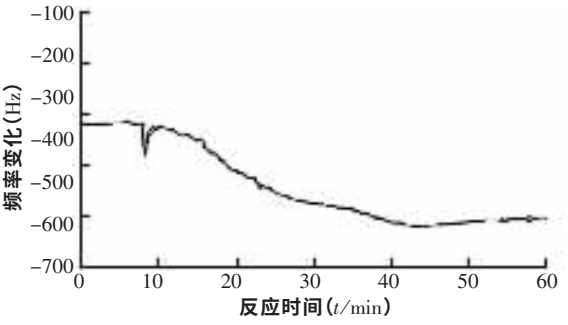


图 2　晶体频率降低值与尖吻腹蛇毒抗原抗体反应时间关系

2.3　压电石英晶体免疫微阵列传感器检测蛇毒的标准曲线制作

在蛇毒液浓度为 0.01、0.1、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 μg/ml 时,晶体频率变化均值依次为(5 ± 7)、(15 ± 8)、(71 ± 10)、(133 ± 14)、(245 ± 21)、(457 ± 33)、(465 ± 31) Hz,统计显示,蛇毒液浓度为 0.1、0.5、1.0、2.0、4.0 μg/ml 时的晶体频率变化均值与前一个浓度级比较,均有显著差异($P < 0.01$),0.01 μg/ml 蛇毒液与空白液比较、8.0 μg/ml 蛇毒液与 4.0 μg/ml 比较,频率变化无明显统计差异,提示浓度 0.1 μg/ml 以下,晶体频率的特异性响应信号被噪声信号淹没,不能敏感检测蛇毒浓度;当蛇毒浓度大于 4.0 μg/ml 时,由于固定在晶体表面的抗体结合位点趋于饱和,尽管反应液中存在蛇毒分子,石英晶体表面质量负载已不再增加,此结果与抗原抗体的免疫反应规律相符合。同时,蛇毒浓度在 0.1 ~ 4.0 μg/ml 范围内,蛇毒的浓度与晶体频率变化值之间呈良好的线性关系,以蛇毒标准溶液的浓度为横坐标,晶体频率的变化值为纵坐标作图,得到蛇毒石英晶体传感器的检测剂量反应曲线,见图 3。

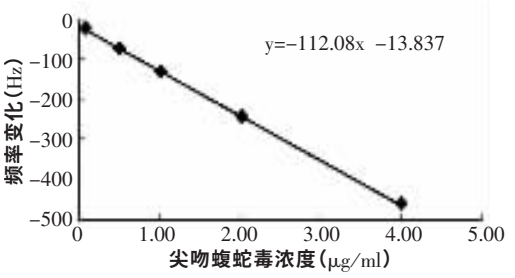


图 3　尖吻蝮蛇毒浓度与晶体频率变化关系

3 讨论

目前蛇伤的检测方法主要有放射免疫测定法、凝集测定法、荧光免疫测定、聚合酶链反应、光学免疫检测法和 ELISA 等[8,9]，存在的问题主要在于检测的特异性和敏感性不高，快速性和方便性方面有欠缺。利用蛇毒抗原抗体的免疫识别特性，可以应用压电石英晶体免疫传感器对多种抗原或抗体进行快速的定量测定，检测过程中避免了复杂的标记过程及同位素对环境的污染，克服了前面几种方法费时、昂贵、及操作复杂的缺点，具有灵敏度高(可达纳克级)，速度快、特异性好和实时检测等优点[10]。

抗体的固定是构建传感器的基本条件。我们利用巯基化合物自组装单分子层的原理，通过 Sulfo-LC-SPDP 在蛇毒抗体上修饰一个活性巯基，而后通过活性 S 原子与金膜电极表面金原子的强烈键合作用，将蛇毒抗体固定于压电传感器的金膜电极表面，可构成结合牢固、紧密有序、分布均匀、空间取向一致的抗体敏感膜，为传感器的定量检测奠定了基础。Sulfo-LC-SPDP 分子结构中带有一较长的分子臂，增加了所固定抗体分子与金膜之间的距离，有效地克服了分子识别过程中的空间位阻，且巯基分子小，在金膜表面结合更加致密[11]。从金膜上固定抗体的量与抗体浓度的关系中可以看出，随着抗体浓度的增加，抗体固定到金膜上的量也增加。在实验所用抗体浓度达到 3.00 μg/ml 后，金膜结合抗体的位点达到饱和。实验均采用 3.00 μg/ml 抗体浓度，保证了传感器上固定抗体量的一致。

稳定性是影响其技术测定的主要因素之一。晶体在液相中振荡要受多种因素的影响，如外界温度、磁场、气压、震动，液体的粘度、密度、电导性，当然最重要的影响因素是振荡电路和晶体本身。我们在总结其他研究的基础上，设计了一种有负反馈的集成振荡电路，能消除或减少以上因素的影响。本实验设立的对照检测池气相和液相均能在较长时间内保持频率稳定，证明整个检测系统稳定可靠，同时也表明其他检测池的频率漂移是由抗体固定或抗原抗体反应所致。

敏感性将是基因传感器阵列能否得到推广并应用于临床的限制因素。根据 Sauerbrey 方程，参照 AT 切型石英的弹性膜量和密度常数，可得 $\triangle f = -2.26 \times 10^{-3} f^2 \triangle m$，10 MHz 石英晶体的灵敏度为 $\triangle m / \triangle f = -1/(2.26 \times 10^{-3} \times 10^2) = -4.425\ ng \cdot cm^{-2} \cdot Hz^{-1}$。其灵敏度可达纳克级，提示尖吻蝮蛇毒压电石英晶体免疫传感器理论上完全能用于尖吻蝮蛇毒的定量检测。本实验建立的压电免疫传感器阵列检测尖吻蝮蛇毒的标准曲线显示，尖吻蝮蛇毒浓度在 0.1 ~ 4.0 μg/ml 的范围内，石英晶体的振荡频率变化与尖吻蝮蛇毒的浓度呈良好的线性关系，传感器有良好的响应特性。当蛇毒浓度大于 4.0 μg/ml 时，晶体频率不再有明显变化，与蛇毒浓度不再呈线性关系，浓度低于 0.1 μg/ml 时，频率响应信号弱，容易被噪声淹没。因此可以得出，该方法检测尖吻蝮蛇毒的线性范围为 0.1 ~ 4.0 μg/ml。如果标本浓度超过 4.0 μg/ml，标本需稀释后检测。蛇毒传感器阵列灵敏度与石英晶片的品质及抗体的固定方法等有关。利用微细刻蚀加工技术进行改进，提高其灵敏度，将是今后进一步研究的方向。

特异性是压电免疫传感器阵列能否应用于蛇毒检测的关键因素。蛇毒均是复杂的蛋白混合体，亲缘紧密的毒蛇蛇毒趋向于有一定的共同抗原，因此不同蛇毒间将会存在一定的交叉免疫反应。在后续的实验中，我们将对压电传感器阵列检测的特异性进行深入探讨。随着技术的不断成熟和完善，压电免疫传感器有望为蛇伤急救提供更有效的快速诊断手段。

参考文献：

[1] Frangides C Y. Koulouras V, Kouni S N, *et al*. Snake venom poisoning in Greece. Experiences with 147 cases[J]. Eur J Intern Med, 2006, 17(1): 24 - 27.

[2] Blaylock R. Epidemiology of snakebite in Eshowe, KwaZulu-Natal, South Africa[J]. Toxicon, 2004, 43(2): 159 - 166.

[3] 刘明华, 文 亮, 徐世伟, 等. 毒蛇伤害126例流行病学分析[J]. 中国急救医学杂志, 2007, 27(7): 605 - 608.

[4] Hachimi K, Fnini S, El-Andaloussi Y, *et al*. Snake bite poisoning and compartment syndrome. A report of two cases[J]. Chir Main, 2005, 24(3 - 4): 184 - 186.

[5] Ozay G, Bosnak M, Ece A, *et al*. Clinical characteristics of children with snakebite poisoning and management of complications in the pediatric intensive care unit[J]. Pediatr Int, 2005, 47(6): 669 - 675.

[6] Sharma N, Chauhan S, Faruqi S, *et al*. Snake envenomation in a north Indian hospital[J]. Emerg Med J, 2005, 22(2): 118 - 120.

[7] O'Leary M A, Isbister G K, Schneider J J, *et al*. Enzyme immunoassays in brown snake (Pseudonaja spp.) envenoming: Detecting venom, antivenom and venom-antivenom complexes[J]. Toxicon, 2006, 48(1): 4 - 11.

[8] 车 军, 刘洁生, 杨维东, 等. 蛇毒检测技术研究进展[J]. 动物学杂志, 2002, 37(1): 76 - 79.

[9] Dong le V, Eng K H, Quyen le K, *et al*. Optical immunoassay for snake venom detection[J]. Biosens Bioelectron, 2004, 19(10): 1285 - 1294.

[10] 詹爱军, 王新卫, 于康震. 压电免疫传感器的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(4): 762 - 765.

[11] 张 波, 府伟灵, 毛琼国, 等. 压电免疫传感器两种抗体固定方法的比较研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2004, 14(1): 11 - 14.

(编辑 栾 嘉)