论著

文章编号:1000-5404(2011)07-0658-05

表面等离子体免疫传感器同步定量尿液中多种微量蛋白的研究

罗 阳[1],张 波[1],高维寅[1],陈 鸣[2],蒋天伦[3],刘 星[1],王 珏[1],府伟灵[1] (400038 重庆,第三军医大学西南医院:检验科[1],输血科[3];400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所检验科[2])

【摘要】 **目的** 探讨并建立表面等离子体免疫传感器芯片同步定量尿液中多种微量蛋白的方法。**方法** 采用EDC/NHS方法将微量白蛋白(MA)、α-1微球蛋白(A1M)、β-2微球蛋白(B2M)、尿IgG的单克隆抗体固定于免疫传感器芯片之上,并用表面等离子体共振传感器(surface plasmon resonance,SPR)检测样本中微量蛋白的含量。利用4种微量蛋白的标准血清建立标准曲线,然后对其进行灵敏度、特异性等指标的方法学评价。以免疫散射比浊方法为参考方法,检测125例临床患者24 h尿液样本的微量蛋白浓度,比较2种方法检测相同样本时的结果差异。**结果** 该表面等离子体共振免疫传感器芯片具有良好的操作性能和检测特异性。其标准曲线的R^2均在0.98以上。其检测灵敏度分别是A1M为5 μg/L,B2M为7.3 μg/L,MA为11.5 μg/L,IgG为22 μg/L。所有4项指标可在20 min之内同步完成。与微量蛋白检测的经典方法免疫散射比浊法相比,两者的相关性和一致性较高。**结论** 表面等离子体免疫传感器芯片可实现尿液中多种微量蛋白的快速、准确、同步定量。

【关键词】 表面等离子体共振;免疫传感器芯片;微量蛋白;检测
【中图法分类号】 R446.12;R446.61;R319 【文献标志码】 A

Simultaneous determining multiple trace proteins in urine with surface plasmon resonance biosensor

Luo Yang[1], Zhang Bo[1], Gao Weiyin[1], Chen Ming[2], Jiang Tianlun[3], Liu Xing[1], Wang Jue[1], Fu Weiling[1] ([1]Department of Clinical Laboratory, [3]Blood Bank, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Department of Clinical Laboratory, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

【**Abstract**】 Objective To establish a novel methodology for simultaneous quantification of four trace proteins in urine with surface plasmon resonance (SPR) biosensor. Methods Monoclonal antibodies against Alpha-1 microglobulin (A1M), Beta-2 microglobulin (B2M), microalbumin (MA) and immunoglobulin G (IgG) were immobilized on the surface of biosensor chips, and then SPR was adopted to detect the corresponding antigens in standard solution containing the above-mentioned proteins. Calibrations of the 4 proteins were performed and the methodological evaluations were conducted to validate the sensitivity and specificity. Clinical urine samples from 125 inpatients were collected, and the contents of these 4 proteins were detected with SPR and immuno-turbidimetric assay at the same time. The results from the 2 methods were compared. Results The proposed SPR immunosensor had good signal-noise ratio and specificity. All the R^2 of the calibration curves were higher than 0.98. The sensitivity of A1M was 5 μg/L, B2M 7.3 μg/L, MA 11.5 μg/L, and IgG 22 μg/L. All the detection was finished in 20 min. This proposed method had good consistency when compared with traditional immuno-turbidimetric assay. Conclusion This proposed SPR immunosensor chip can accurately and simultaneously determine multiple trace proteins in urine, and can be a useful alternative to current methodology.

【**Key words**】 surface plasmon resonance; immunosensor chip; trace proteins; detection

Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program, 2007AA02Z416), the National Natural Science Foundation of China (30927002, 30900348), the Tackling Program of the "Eleventh Five-year Plan" for Medical Science Development of PLA (08G089) and the Tackling Project of Key Sci & Tech Research of Chongqing (CSTC2010AA5042). Corresponding author: Fu Weiling, Tel: 86-23-68754429, E-mail: weilingfu@yahoo.com

【基金项目】 国家高技术研究发展计划(863计划,2007AA02Z416);国家自然科学基金(30927002, 30900348);全军医学科研"十一五"计划科技攻关项目(08G089);重庆市重点科技攻关项目(CSTC2010AA5042)
【通信作者】 府伟灵,电话:(023)68754429,E-mail:weilingfu@yahoo.com

目前临床上对特种微量蛋白的定量检测方法主要以免疫比浊法、荧光免疫法、ELISA、放免法等为主。免疫比浊法自动化程度高,检测时间短,精密度优于放免法,为目前临床上常用的特种微量蛋白检测方法,但其配套仪器及试剂价格昂贵,且仪器必须配合特定试剂使用[1];荧光免疫法结果准确,灵敏度高,但操作复杂、费时,且需荧光标记;ELISA灵敏度、精密度均较高,操作简便,但无法对特种微量蛋白进行准确定量;放免法具有灵敏度高、检出限低的优点,但需用^{125}I或^{32}P等放射性核素标记,极易导致人体的放射性暴露。因此,临床上迫切需要建立一种准确、快速、无需标记、实时动态监测的检测方法[2]。

近年来,生物传感器在抗原-抗体复合物的快速检测方面已经获得大量研究进展,相继出现了利用表面等离子体共振(SPR)、压电石英晶体微天平(QCM)、漏声表面波(LSW)等能进行蛋白质快速检测的传感器[3-9]。SPR因其具有无需标记、准确性高的特点在传感器领域取得了较快发展[10-11]。同时,采用光线反射原理的SPR传感器可避免样本中干扰物的影响,因而可实现浑浊样本的检测,此特点在尿液、漏出液等较浑浊样本的临床实验室检测中具有极其重要的意义[12]。常规的SPR传感器采用单通道技术,每次仅能检测单个指标,故使其在临床的应用受到限制[13]。本实验即在现有单通道SPR传感器的基础上,开发出适合于多蛋白指标检测的SPR免疫传感器芯片,以应用于临床实验室中对于浑浊样本尤其是尿液中A1M、B2M、MA、IgG的同步检测,以期为临床实验室诊断浑浊样本提供一种新的技术方案。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

人微量白蛋白(microalbumin, MA)标准血清及其单克隆抗体、人α-1微球蛋白(α-1 microglobulin, A1M)标准血清及其单克隆抗体、人β-2微球蛋白(β-2 microglobulin, B2M)标准血清及其单克隆抗体均购自美国Sigma-Aldrich公司;人免疫球蛋白(IgG)及其单克隆抗体购自美国Beckman公司。PBS缓冲液:0.05 mol/L,pH=7.2,自行配制。所用其他试剂均为AR级。EDC、N-羟基琥珀酸亚胺(NHS)、牛血清白蛋白(BSA)、葡聚糖均购自Sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 芯片表面的预处理 将芯片浸入1 mol/L的NaOH溶液中浸泡10 min,用三蒸水清洗后,浸入1 mol/L的盐酸(HCl)溶液中浸泡10 min,三蒸水及95%乙醇清洗后,常温氮气吹干备用。

1.2.2 抗体包被 抗体分子的固定按照课题组前期建立的方法进行[9]。其主要过程如下:将上述处理后金膜的表面浸入5×10^{-3} mol/L巯基十一烷醇的乙醇:水(体积比4:1)溶液中反应6 h,以形成亲水性表面。然后浸入0.6 mol/L的表氯醇(溶剂为0.4 mol/L的氢氧化钠和二甘醇二甲醚1:1的混合液)溶液中反应4 h。依次经去离子水、乙醇、去离子水彻底清洗后,在葡聚糖溶液(将3 g葡聚糖溶于10 ml的0.1 mol/L氢氧化钠溶液中)中处理传感表面20 h。浸入1 mol/L溴乙酸(溶剂为2 mol/L的氢氧化钠)中反应16 h以形成羧甲基化基体,用于共价固定蛋白质分子;之后浸入EDC和NHS(1:1)的混合溶液6 h,来激活表面的羧基基团(-COOH);然后浸入浓度为0.02 mg/ml的抗4种微量蛋白的单克隆抗体溶液2 h;最后用0.2 mol/L的乙醇胺盐酸缓冲液来屏蔽没有反应的NHS和羧基形成的中间体。这样就完成了单克隆抗体在金膜表面的包被。

1.2.3 标准品制备 初始配制A1M、B2M、MA、IgG标准品浓度均为1 000 mg/L,对其稀释成以下浓度:0.1、1.0、5.0、10.0、50.0、100.0 mg/L,每次检测时标本的加入量为15 μl。

1.2.4 重复实验和回收实验 将1 000 mg/L的标准品用PBS缓冲液稀释为20、100、500 mg/L 3种浓度梯度,然后将上述稀释的标准品分别进行重复性实验:日内检测(每种浓度测定20次)和日间检测(每种浓度每天测定1次,连续测定20 d)。回收实验:在A,B,C 3根试管(15 ml)中分别加入样品IgG的上述PBS缓冲液稀释后的标准品(20、100、500 mg/L)各5 ml,低、中、高3种稀释后浓度样品分别加入1 000 mg/L的IgG(即标准血清)0.1、0.5、2.5 ml,分别重复测定20次。通过公式计算出不同加入浓度样本的回收率。

1.2.5 方法学比较实验 收集2010年3-9月间125例西南医院住院患者的24 h尿标本,其中男性70例,女性55例,平均37岁。采集后采用-20 ℃低温保存,加入1 mol/L的HCl或者NaOH使尿液标本的pH稳定在7~8之间,同时加入蛋白酶k抑制剂。然后分别用SPR传感器芯片和免疫散射比浊方法(IMAGE COULTER)检测这些临床样品。

1.2.6 SPR传感器特异性实验 配制浓度均为100 mg/L的A1M、B2M、MA、IgG标准品,分别用包被A1M、B2M、MA、IgG单克隆抗体的SPR依次检测上述标准品溶液,每次检测时标本的加入量为15 μl。

1.3 统计学分析

标准曲线和相关分析采用Origin 8.0作图,方法学比较实验(Bland-Altman)由统计软件Medcalc 11.4绘制。

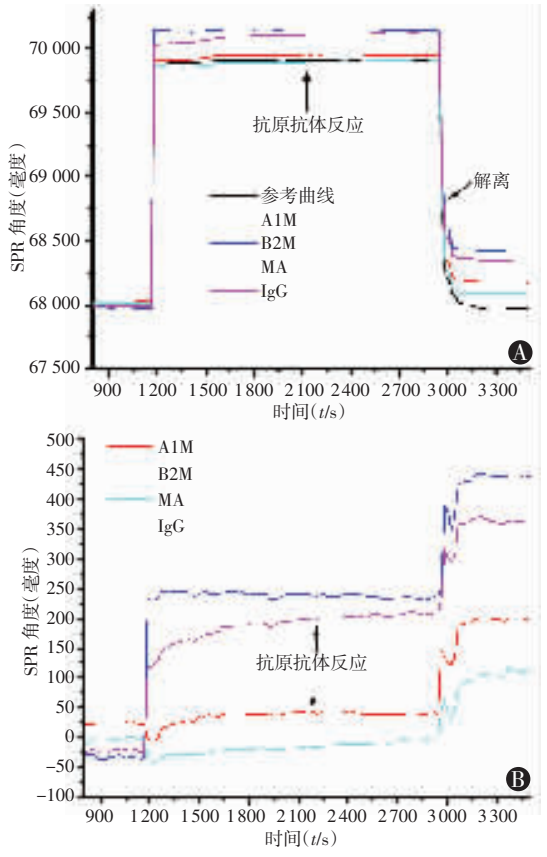
2 结果

2.1 SPR传感器实时检测

用传感器免疫传感器芯片检测4种尿液中的微量蛋白,结果显示1 200 s时,抗原抗体反应达到了70 000毫度,且B2M毫度最高,其次是IgG、A1M、MA,在3 000 s时出现解离;B2M的SPR角度变化了273毫度(图1),经过减去参考值后,整个变化趋势显得更为明显、直观,便于分析。

2.2 传感器免疫传感器芯片检测的标准曲线

4种微量蛋白在相同检测条件下,随着加入微量蛋白浓度的升高,SPR角呈线性升高;所有4个蛋白的标准曲线进行线性拟合后R^2均高于0.98(图2)。



A:检测结果原始数据分析;B:原始数据减去参考值的示意图

图1 免疫传感器芯片检测尿液中微量蛋白的实时监测分析

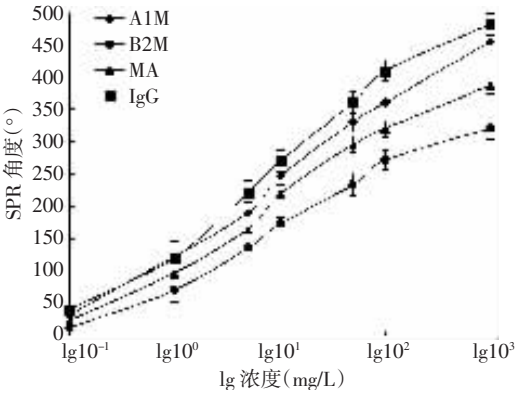


图2 4种微量蛋白的标准曲线分析

2.3 传感器再生实验

分别采用0.1 mmol/L的HCl,30 mmol/L的EDTA对SPR传感器芯片进行再生实验,结果表明,2种方法对芯片处理相同时间(10 min)后,随着再生次数的增加,检测相同浓度标准品时其SPR角的变化值逐渐减小,在50次再生循环以前,2种方法几乎都取得较好效果,但是在随后的再生次数中,EDTA再生的下降幅度更大,说明在经过多次再生后,EDTA对包被抗体的影响大于HCl(图3)。

2.4 SPR传感器特异性实验

用MA、A1M、B2M、IgG单克隆抗体包被的SPR传感器分别对MA、A1M、B2M、IgG的标准血清逐一进行检测,结果表明,SPR传感器和特异性的蛋白抗原结合,其SPR偏转角度都在800°以上,而和非特异性的蛋白结合后的SPR偏转角度均小于4°(图4)。

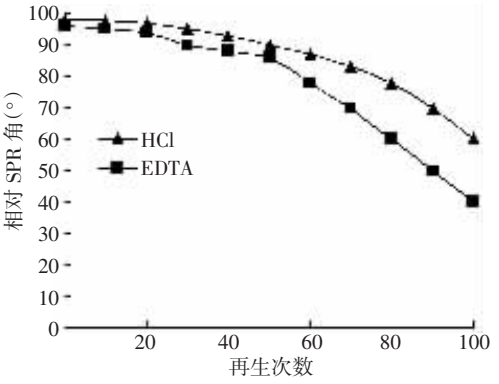


图3 SPR芯片再生次数与SPR角变化的关系

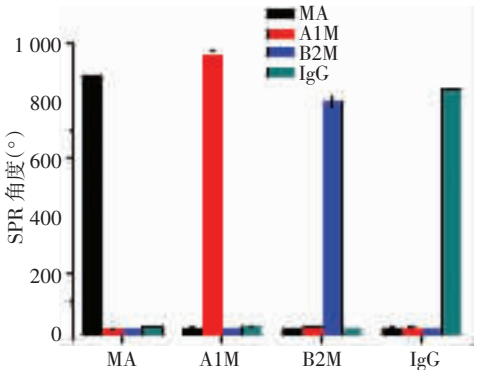


图4 包被蛋白抗体的SPR和4种蛋白反应的角度变化

2.5 重复实验

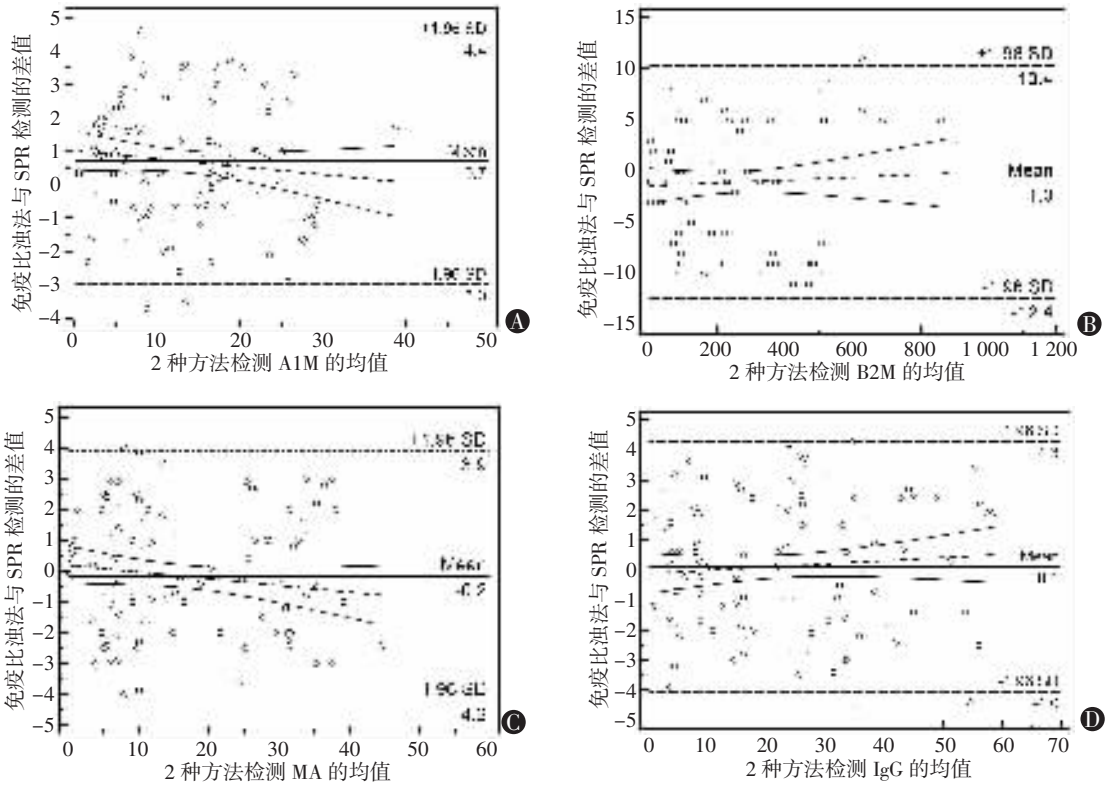
将不同蛋白样品依次放入SPR免疫传感器芯片中进行测定,质控样本重复实验的检测结果显示:4种蛋白浓度为100 mg/L时,其检测值的日内差异分别为5.34%、5.58%、6.52%和4.68%,而日间*CV*在7.56%~9.38%之间波动。

2.6 临床样本检测结果比较

分别用2种方法(SPR免疫传感器芯片法和免疫散射比浊法)检测相同的样本共125例,检测结果运用Altman-bland曲线进行统计分析。结果显示,大部分数据都分布在均值的2SD范围内,且呈现均一的散在分布(图5)。

3 讨论

尿微量蛋白的实验室检测结果对于糖尿病肾病具有重要的诊断价值。其中尿微量白蛋白更是其诊断性标志物[9]。美国糖尿病协会规定尿液中微量白蛋白实验室诊断标准为浓度高于300 μg/L,MA结合小分子量蛋白(A1M和B2M)更具有诊断价值。然而其准确定量对于临床实验室则是一个难题,因为B2M在尿液中的稳定性较差,尤其是在pH<5的酸性尿中稳定性极差[10-13]。为了能够准确定量B2M,我们采用了24 h尿液作为标本来源,并且在标本采集后立即加入1 mol/L的HCl或者NaOH使尿液标本的pH稳定在7~8之间,同时加入蛋白酶抑制剂,以防止蛋白的降



A:A1M 检测结果;B:B2M 检测结果;C:MA 检测结果;D:IgG 检测结果

图 5　4 种尿微量蛋白分别进行 SPR 和 INM 检测结果的 Altman-bland 分析

解。检测结果显示其效果明显,说明该样本前处理方法是高度有效的。

传感器再生实验结果表明,处理 SPR 芯片 DETA 和 HCl 在较少次数内(50 次)效果相当;但在更多次数的再生处理过程中,经过 EDTA 处理的 SPR 芯片对其上包被的抗体影响较大,在对实验条件较为苛刻的芯片技术中,这种影响不能忽视。课题组经过认真分析初步认为,EDTA 对 SPR 芯片再生实验的影响主要为 EDTA 和蛋白中的金属离子建立了螯合结构,使其少量结合在了 SPR 包被的抗体上,而 SPR 作为灵敏度极高的检测手段,少量的 EDTA 残留也会带来再生实验比较明显的差别,并且这种影响出现在较多次使用 EDTA 处理 SPR 芯片的情况下[14]。因此,为获得更佳的数据,后续实验均采用 HCl 溶液进行再生。

建立或者改良一种新的检测方法,必须对其灵敏度、特异性、线性范围、检测时间等反映该方法性能的多方面指标进行评估。本方法核心为抗原-抗体结合反应,因此 SPR 的特异性主要由抗原抗体结合的特异性来决定。SPR 特异性实验结果显示本实验中包被单克隆抗体的 SPR 和非特异性抗原蛋白结合,SPR 角度变化值在 4°以内;而包被单克隆抗体的 SPR 和特异性抗原蛋白结合,SPR 角度偏转在 800°以上。结果很清楚的显示,包被单克隆抗体 SPR 的特异性极高,检测体系中所有的非特异性响应低,均在空白响应值内,不会互相干扰,能满足临床检测的需要[15]。对于其他理化因素是否会对实验结果产生影响,还需进一步实验进行验证和探讨。

本实验采用回收实验对 SPR 免疫传感器的准确度进行了验证。所谓回收实验即判断准确测定加入分析样品中的纯分析物的能力,其目的是测定比例系统误差,以衡量候选方法的准确度。本实验中,低浓度的回收率达到了 94.5%,中浓度标准品的回收率达到了 102.57%,高浓度标准品的回收率达到了 105.68%,说明本实验的准确度较高。重复实验结果表明日内精密度较高,无论是高值还是低值,*CV* 值都比较低,波动在 4.68% ~6.52% 之间;但日间差异略大,*CV* 在 7.56% ~9.38% 之间波动。尽管如此,本方法测定尿微量蛋白的结果仍较准确,能够满足临床检测需要。

本方法的检出限以空白信号的均值加上 3 倍标准差来确定,以此得到免疫传感器芯片检测 4 种尿微量蛋白的检出限分别为:A1M 为 5 μg/L,B2M 为 7.3 μg/L,MA 为 11.5 μg/L,IgG 为 22 μg/L,检测灵敏度与放射免疫分析法相当,超过了 ELISA 法、火箭免疫电泳自显影法[16]。但与上述标记免疫分析技术相比,主要表现在检测上限降低,其线性检测范围变窄。这主要由于传感器芯片表面积较小,抗体固定量相对减少造成的。由此看出,检测系统不能为了高集成、阵列化而一味追求传感器芯片的微小化。其后如何解决 SPR 传

感器的微型化与传感器检测线性范围的矛盾，达到最大限度微型化和最大检测范围的完美统一，还需进一步研究和探讨。

无需标记是SPR检测技术的最核心优势，用于蛋白质与蛋白质间的反应检测，具有得天独厚的优势。本方法与传统方法相比，加入缓冲液的平衡时间约为3～5 min，抗原抗体结合时间为10～15 min。故在37 ℃及适宜反应条件下，整个免疫反应可在20 min内完成。本方法检测时间较ELISA或者免疫散射比浊方法缩短了2/3。如果单独测定蛋白质之间结合常数或者解离常数，则无需待整个反应完全结束即可得到所关心的数据，从而可进一步缩短检测时间。

利用SPR传感器对125例临床标本分别进行A1M、B2M、MA、IgG检测，其检测结果与相应的免疫散射比浊检测方法进行相关分析，其R^2依次为0.926、0.958、0.959、0.937。Altman-bland分析结果表明，尽管2种方法存在一定的结果偏差，然而98%以上的数据均处于95%可信区间内，提示尿微量蛋白SPR免疫传感器芯片的检测结果同传统免疫散射比浊分析方法相比吻合度较高，可用于尿液中微量蛋白的临床检测，为尿微量蛋白的联合检测提供了一种简便、快速的新方法。

参考文献：

[1] 孙虹，王凡，孙鹭，等. 透射和散射比浊法测定血清免疫球蛋白的评价[J]. 临床检验杂志，2005，23(3)：189－191.

[2] 徐霞，叶尊忠，吴坚，等. 表面等离子体共振免疫传感器在蛋白质检测中的应用及其研究进展[J]. 分析化学，2010，38(7)：1052－1059.

[3] Wang Y，Chen M，Zhang L，*et al*. Rapid detection of human papilloma virus using a novel leaky surface acoustic wave peptide nucleic acid biosensor[J]. Biosens Bioelectron，2009，24(12)：3455－3460.

[4] Luo Y，Chen M，Wen Q，*et al*. Rapid and simultaneous quantification of 4 urinary proteins by piezoelectric quartz crystal microbalance immunosensor array[J]. Clin Chem，2006，52(12)：2273－2280.

[5] Yao C，Zhu T，Tang J，*et al*. Hybridization assay of hepatitis B virus by QCM peptide nucleic acid biosensor[J]. Biosens Bioelectron，2008，23(6)：879－885.

[6] 王云霞，陈鸣，姚春艳，等. 漏声表面波生物传感器不同检测方法的实验研究[J]. 中华医院感染学杂志，2008，18(3)：349－352.

[7] 罗阳，陈鸣，张波，等. 尿β_2微球蛋白压电传感器阵列的构建与临床应用[J]. 中华医院感染学杂志，2008，18(3)：328－331.

[8] 王云霞，张立群，罗阳，等. 漏声表面波传感器生物信号放大系统的研究[J]. 第三军医大学学报，2009，31(11)：1013－1016.

[9] 刘明华，姚婕，向强，等. 压电免疫传感器阵列检测尖吻蝮蛇毒的初步研究[J]. 第三军医大学学报，2009，31(12)：1158－1160.

[10] 李燕，隋成华，许晓军. 角度指示型表面等离子共振传感器的研究[J]. 光学仪器，2008，30(5)：31－34.

[11] 顾大勇，石磊，禹华伟，等. 基于表面等离子体共振检测原理的基因芯片的构建[J]. 生物医学工程学杂志，2008，25(6)：1415－1419.

[12] Moyroud E，Reymond M C，Hames C，*et al*. The analysis of entire gene promoters by surface plasmon resonance[J]. Plant J，2009，59(5)：851－858.

[13] Wang J，Munir A，Zhou H S. Au NPs-aptamer conjugates as a powerful competitive reagent for ultrasensitive detection of small molecules by surface plasmon resonance spectroscopy[J]. Talanta，2009，79(1)：72－76.

[14] 欧惠超，姜浩，周宏敏，等. 五种SPR传感芯片的再生制备及其应用[J]. 中国生物工程杂志，2009，29(1)：44－49.

[15] 郝鹏，吴一辉. 基于噪声分析的波长表面等离子体共振分析仪的数据处理[J]. 光学精密工程，2009，17(9)：2159－2164.

[16] 吕礼应. 免疫透射比浊测定脑脊液免疫球蛋白[J]. 上海医学检验杂志，2003，18(4)：223－225.

（收稿 2010-11-24 修回 2011-01-13）

（编辑 王 红）

（上接657页）

疼痛是不可避免的。如果患者出现疼痛，应观察疼痛情况及部位，排除急腹症、穿孔等情况，告之疼痛是正常现象，如不能忍受应及时报告医师处理。该患者术后出现胸骨后疼痛，遵医嘱给予芬太尼透皮贴剂4.2 mg贴胸，哌替啶50 mg肌注后缓解。③饮食护理：术后禁食24 h，禁食期间给予静脉营养支持，如无特殊情况术后24 h给予少量冷流质饮食，如牛奶、稀饭，再逐渐过渡到无渣温热半流质饮食、软食。由于术后胃液容易反流至食管，嘱患者餐后2～3 h不要平卧，同时避免弯腰、提取重物等，以免增加胃酸反流的机会，也可采用体位的改变，如双臂抬高超过头部、胸背伸直或直立等姿势，帮助增大食管内压力，促进食管排空[3]。进食过程中观察患者是否有吞咽困难、呛咳、呕吐等情况。

3.4 出院指导

嘱患者避免精神紧张，保持愉快的心情，养成良好的饮食习惯，少食多餐，避免食物过冷或过热，注意细嚼慢咽，减少食物对食管的刺激，禁食刺激性食物及粗糙食物，保持大便通畅。如出现不适应及时来医院就诊。遵医嘱坚持服用抑酸保胃药。

4 讨论

POEM是一种通过内镜治疗贲门失迟缓症的新方法，创伤小、费用低、住院时间短，该患者治疗效果明显，是一种值得临床推广的新手术方式。在POEM围手术期的护理过程中，我们体会到术前准备、精湛的内镜治疗技术及术后病情的严密观察、出院的健康教育是保证手术成功的重要因素。

参考文献：

[1] 马颖才，熊元治，周翠萍，等. 内镜直视下贲门失弛缓症的气囊扩张治疗[J]. 中华消化内镜杂志，2002，19(3)：174－175.

[2] 潘云. 腹腔镜妇科手术中二氧化碳气腹对呼吸循环指标的影响[J]. 现代妇产科进展，2007，16(1)：60－61.

[3] 邴敏，郭艳芳. 内镜下注射肉毒毒素治疗贲门失弛缓症的护理[J]. 西北国防医学杂志，2008，29(4)：316－317.

（收稿 2010-12-24 修回 2011-03-11）

（编辑 张 维）