文章编号:1000-5404(2012)08-0765-03

论著

快速检测TOX、CMV IgG抗体的适配子型SPR传感器微阵列的初步构建

刘 星[1],秦莲花[2],罗 阳[1],苗 杰[1],王 丰[1],黄 庆[1],黄君富[1],胡忠义[2],府伟灵[1] (400038 重庆,第三军医大学西南医院检验科[1];200433 上海,同济大学附属上海市肺科医院、上海市结核病(肺)重点实验室[2])

[**摘要**] **目的** 初步构建弓形虫(*toxoplasma gondii*, TOX)、巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)IgG抗体的适配子型SPR传感器微阵列的快速检测方法。**方法** 采用SELEX技术筛选TOX、CMV IgG的适配子,并将其整合于SPR生物传感器实时在线分析系统,通过在传感器表面固定探针分子,对溶液中的TOX、CMV IgG进行杂交检测,并进一步研究该检测方法的稳定性与线性检范围。**结果** 该新型快速检测方法能够实现对TOX、CMV IgG的实时检测,检测系统稳定性良好,八通道间检测时互不影响,线性检测范围为20~300 μmol/L。**结论** 该实验建立的快速检测方法,具有稳定性好等优点,SPR传感器技术结合适配子技术在临床诊断工作中有着广阔的应用前景。

[**关键词**] 生物芯片;适配子;SPR传感器
[**中图法分类号**] R319;R392.11;R446.62 [**文献标志码**] A

Construction of aptamer-based surface plasma resonance biosensor microarray for the rapid detection of *toxoplasma godii* and cytomegalovirus IgG antibodies

Liu Xing[1], Qin Lianhua[2], Luo Yang[1], Miao Jie[1], Wang Feng[1], Huang Qing[1], Huang Junfu[1], Hu Zhongyi[2], Fu Weiling[1] ([1]Department of medical Laboratory, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2] Affiliated Pneumology Hospital of Tongji University, Shanghai Key Laboratory of Tuberculosis, Shanghai, 200433, China)

[**Abstract**] **Objective** To construct the aptamer-based surface plasma resonance (SPR) microarray for rapid assay of *toxoplasma gondii* (TOX) and cytomegalovirus (CMV) IgG antibodies. **Methods** Aptamers of the TOX gondii and CMV IgG antibodies were screened with the SELEX technique and integrated into the real-time online analyzing system on the SPR biosensor. Hybridization of TOX and CMV IgG antibodies in solution was detected according to the probe molecules fixed on the surface of biosensor. The stability and linear detection range of this assay were further investigated. **Results** The novel rapid method could assay the TOX and CMV IgG antibodies with a good stability and a linear assay range of 20 to 300 μmol/L. **Conclusion** The stability of the rapid assay we established is good. Combined SPR biosensor and aptamer techniques have a broad prospect in clinical assay of TOX and CMV IgG antibody level.

[**Key words**] biochip; aptamer; surface plasma resonance biosensor

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30900348, 30927002). Corresponding author: Fu Weiling, Tel: 86-23-68754429, E-mail: weilingfu@yahoo.com

我国目前诊断临床普遍采用酶联免疫吸附测定法(ELISA法)[1]、金标法[2]等检测孕龄妇女血清TOX-IgG和CMV-IgG的水平,假阳性率较高,不能为临床提供准确的诊断依据。适配子(aptamers)[3-4]是人工合成的寡核苷酸片段,近年来生物医学领域研究的热点之一,其能识别靶物质上的微妙结构,因此具有极高的特异性。同时,近年来表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)技术[5]因其具有实时监测反应动态过程、灵敏度较高、无需标记、无背景干扰、成本低廉等特点,被认为是生物分子检测的理想检测器件,已经成为临床实验诊断领域研究的热点。本研究拟基于课题组原有工作基础上,将适配子同靶分子结合的高特异性和SPR传感器的高灵敏性相结合,构建一种快速检测TOX、CMV IgG抗体的适配子型SPR传感器

[**基金项目**] 国家自然科学基金(30900348,30927002)
[**通信作者**] 府伟灵,电话:(023)68754429,E-mail: weilingfu@yahoo.com

微阵列的临床方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

SPR 表面等离子体共振分析系统(SPR 生物传感器 UMPHOA600B 型,由北京金菩嘉医疗器械有限公司提供),链霉亲和素标记的生物芯片及系统缓冲液。piranha 液:按 30% H_2O_2:浓 H_2SO_4 = 1∶3 的比例自行配制。TOX、CMV 蛋白及其抗体,由美国 ABcam 生化试剂公司提供。构建长度为 78 个碱基的 ssDNA 文库,两端为固定序列,中间 35 个核苷酸为随机序列,库容量为 10^{15} ~ 10^{16},5′-GGGAGCTCAGAATAAACGCTCAA-N35-TTCGACATGAGGCCCGGATC-3′。上游引物为 5′-GGGAGCTCAGAATAAACGCTCAA-3′,下游引物 5′-biotin-$(CH_2)_6$-TTCGACATGAGGCCCGGATC-3′,随机 ssDNA 文库和引物由上海生工生物公司合成。筛选适配子工作,由同济大学附属上海市肺科医院,上海市结核病(肺)重点实验室完成。

1.2 方法

1.2.1 适配子的筛选 我们采用 SELEX 技术对 TOX-IgG 与 CMV-IgG 的抗体进行高亲和性,强特异性的适配子的筛选。

1.2.2 生物芯片金膜的预处理 生物芯片浸置于 piranha 液中 5 min,并轻轻晃动芯片,去除表面气泡,去离子水洗涤。将棱镜晶体浸置于 HCl 中 5 min 后,去离子水洗涤。再将生物芯片浸置于无水乙醇中 5 min,并轻轻晃动,去离子水彻底洗涤后,氮气吹干备用。

1.2.3 适配子的固定 TOX、CMV 适配子以 1 μmol/L 的浓度溶于系统缓冲液中,以 50 μl/min 600 μl 注入芯片表面流池,阴性对照适配子同样以 1 μmol/L 溶于系统缓冲液,以 50 μl/min 600 μl 注入对照流池。反应完成后,包被适配子的芯片表面以 100 μl/min 分别注入 0.01% SDS 100 μl,5 mmol/L HCL 100 μl 再生液老化芯片表面。反应结束后系统缓冲液 125 μl/min,1 200 min 平衡芯片表面。反应在 37 ℃进行。

1.2.4 不同浓度蛋白抗体配制 分别配制成终浓度为:20、40、80、120、160、200、240、300 μmol/L 的 TOX-IgG 与 CMV-IgG。

1.2.5 SPR 传感器检测 用系统缓冲液校准传感器基线,待基线平衡后按照浓度由低到高的顺序依次通入 TOX-IgG 与 CMV-IgG 溶液,参数调整为 200 μl/min 2 000 μl。应用 GMPT 软件(SPR 传感器专用)记录由反应引起的表面等离子共振角度变化值。

2 结果

2.1 适配子传感器检测平台构建结果与稳定性测试

检测仪规格为 8 通道串联检测池,进样台规格为 4 × 4 孔(1.5 ml),4 × 8 孔(0.5 ml),检测模式为平行检测,参考点:可根据需要设定 1 ~ 3 个参考点,进样流速范围为 5 ~ 378 μl/min,流速控制精度为 ± 1 μl/min,系统温度控制范围为 15 ~ 50 ℃(室温 25 ℃),温控精度 ± 0.5 ℃,样品回收方式为 8 通道可各自进行样品回收。检测系统稳定性良好,8 通道间基本不存在干扰,达到了检测系统的要求。将待测溶液依次通过包被 8 种不同探针的串联检测池,进行传感器的稳定性调节,8 通道稳定性良好,结果见图 1。

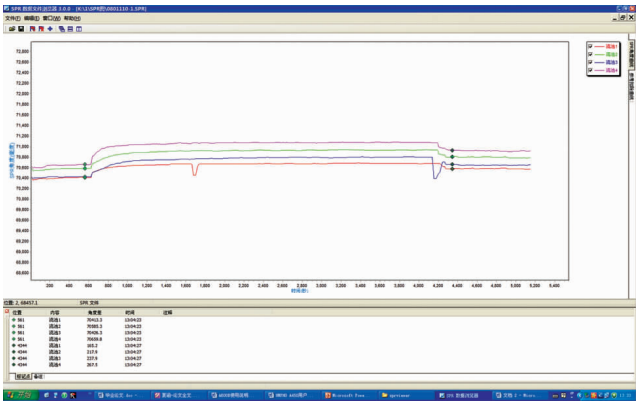


图 1 SPR 生物传感器检测平台频率变化趋势

2.2 传感器实时检测

传感器微阵列检测适配子与抗体结合的实时监测结果见图 2。横坐标时间轴显示,0 ~ 3 500 s 为基线平衡阶段。随后向流池通入固定浓度的蛋白抗体,抗体与适配子发生结合,SPR 检测到 SPR 角度发生了明显改变。3 600 s 开始,抗体与适配子的反应进入平衡期且达到饱和。6 850 s 开始进行解离,向流池中通入系统缓冲液,将未与适配子结合但仍残存在液路中的蛋白抗体洗脱,SPR 检测到 SPR 角度由 73 600 毫度下降至 71 250 毫度。最后我们用洗脱后仪器检测的 SPR 角度减去基线对应的 SPR 角度,就得到了 SPR 角度变化值。第 2 个波动变化曲线为第 2 次检测结果。

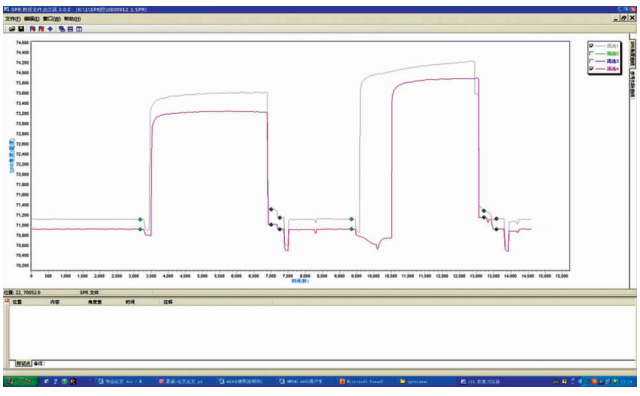


图 2 SPR 生物传感器检测实时响应频率

2.3 传感器的线性检测范围

不同蛋白抗体浓度的 SPR 传感器检测图,见图 3。从图 3 上可以看出,我们得到的 SPR 角度值随着蛋白浓度的变化而发生变化,当通入的蛋白抗体浓度从 20 μmol/L 依次递增至 240 μmol/L时,光学变化呈现逐渐增加的趋势,当蛋白抗体浓度为 300 μmol/L 时,光学值无明显变化,证明检测限大致范围为20 ~ 300 μmol/L,且固定在芯片上的适配子与蛋白抗体结合的饱和浓度比为 1 μmol/L∶240 ~ 300 μmol/L。TOX 与 CMV 的

曲线从图3上可以看出,两者的光学值变化基本一致,在每个蛋白抗体浓度梯度检测时,CMV的SPR角度平均值要比TOX的SPR角度平均值小10~20毫度。

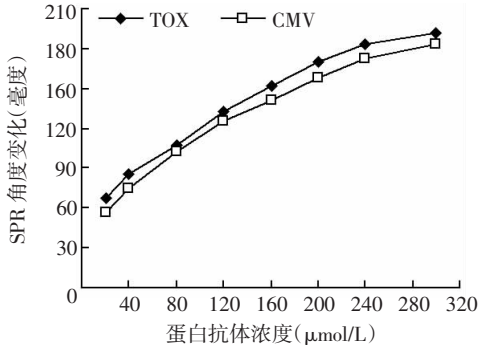


图3 不同蛋白抗体浓度的SPR传感器检测

3 讨论

目前,孕前弓形虫与巨细胞病毒的快速、准确检测可及时预防孕期感染以及有效避免流产,胎儿宫内致畸、窒息等严重并发症。在进行临床诊断时,传统"金标准"法(ELISA法)在检测中容易发生假阳性,检测耗时长,其检测时间通常为1~2 h,检测成本比较高,而且只能进行定性检测。

生物传感器技术的快速发展为实现以上目标提供了良好的技术平台。本实验室在前期成功构建了基于压电原理[6]和漏声表面波的生物传感器,并对检测条件进行了系统优化[7-8]。新近建立的表面等离子共振生物传感器更是采用了光电结合的一大特性,使传感器的检测准确性再次提高,并且大大地提升了传感器的稳定性[9-10]。然而,根据表面等离子共振的光电原理,待检样本的浓度会对SPR传感器SPR角度变化产生影响。因此本研究即是通过配制不同的蛋白抗体浓度,来判断在不同浓度存在条件下,其光学值改变的差异。

本实验成功完成了不同蛋白抗体浓度对SPR传感器检测性能以及生物芯片的包被工作的实验研究。综合光学与分子生物学来看,当适配子型生物芯片包被适配子浓度为1 μmol/L时,传感器最大检测限为240~300 μmol/L。从重复性实验来看,SPR传感器光学改变的范围基本上保持在150~180毫度之间。

其次,适配子固定[11]化也是实验的关键环节,本实验中将适配子的5′端进行巯基修饰,然后将巯基化的适配子与生物芯片的金膜进行交联,完成适配子的固定。该固定方法可获得适宜的适配子密度,杂交反应结果理想,并利于控制实验条件。本实验的完成为后期优化传感器检测平台奠定了坚实了基础,对于病毒检测具有重要的意义。

本实验建立的检测方法分析时间短,靶序列样品检测可在30 min内完成;灵敏度高,检测下限与国外实验室[12]的检测下限有较大程度的提高。SPR生物传感器系统通过光学信号反映传感器表面结合分子的质量,不受电、磁、力等因素的干扰,适用于野外等特殊环境。本实验通过对溶液中的待测序列进行检测,重复性好,出色地实现溶液中核酸的检测,通过进一步设计探针及对微生物进行相应的处理,在未来长期微生物检测工作中将起到举足轻重的作用。

参考文献:

[1] 杨慧兰, 杨军, 刘荣卿, 等. ELISA法检测单纯疱疹病毒Ⅱ型特异性抗体的临床应用研究[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(4): 383-384.

[2] 熊春莲, 陈林俊, 冯浩. 免疫金标法检测D-二聚体的临床应用及结果分析[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(12): 1425-1426.

[3] 彭艳, 冯茂辉, 谢伟. 核酸适配子在临床研究中的进展[J]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2011, 5(4): 1092-1094.

[4] 陈栋, 黄庆, 黄君富, 等. 适配子及其临床诊断的应用进展[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(4): 468-470.

[5] 刘星, 黄庆, 府伟灵. 表面等离子共振生物传感器的研究进展及发展趋势[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(3): 341-343.

[6] 刘明华, 府伟灵, 汪松林, 等. 压电基因传感器阵列的初步构建[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(7): 810-812.

[7] Zhang B, Jiang Y, Kuang H, *et al*. Development of a spiral piezoelectric immunosensor based on thiol self-assembled monolayers for the detection of insulin[J]. J Immunol Methods, 2008, 338(1/2): 7-13.

[8] 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.

[9] 王丰, 夏涵, 陈鸣, 等. 应用压电生物传感器检测HBV感染相关SNP位点的实验研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2008, 18(3): 305-308, 352.

[10] 姚春艳, 齐永志, 府伟灵. 适配子型压电石英晶体传感器检测人免疫球蛋白E的实验研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2008, 18(3): 324-327.

[11] 陈鸣, 府伟灵, 张波, 等. 基因传感器表面两种探针固定法的比较[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(1): 17-19.

[12] Mannelli I, Minunni M, Tombelli S, *et al*. Direct immobilisation of DNA probes for the development of affinity biosensors[J]. Bioelectrochemistry, 2005, 66(1/2): 129-138.

(**收稿**:2011-11-01;**修回**:2012-01-24)

(编辑 邓强庭)