DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.13.023
第25卷第13期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 13
1174 2003年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)13-1174-04

压电石英晶体甲胎蛋白免疫传感器的实验研究

张 波[1],府伟灵[1],毛琼国[2],陈庆海[1],蒋天伦[1],张 雪[1],陈 鸣[1],汤万里[3],俞 凡[4] (第三军医大学:[1]附属西南医院检验科;[2]基础医学部分子遗传学教研室,重庆 400038;[3]中国嘉陵集团生物工程办公室,重庆 400032;[4]信息产业部第26研究所,重庆 400060)

提 要:目的 构建一种新型压电甲胎蛋白(AFP)免疫传感器。方法 AT切向、基频10 MHz的石英晶体用金属夹具和乳胶套圈固定组成检测池,抗人AFP单克隆抗体采用巯基化方法固定在金膜电极表面制成抗体敏感膜,构成压电AFP免疫传感器。结果 构建的压电AFP免疫传感器对AFP的响应特性良好,其线性检测范围为20~1 000 ng/ml,癌胚抗原(CEA)、前列腺特异抗原(PSA)、人绒毛膜促性腺激素(hCG)等对AFP的检测基本无干扰;传感器可再生后重复使用5次;68例临床标本检测结果与放射免疫检测法符合,两种方法的相关系数为0.92,$P<0.01$。结论 研制的压电AFP免疫传感器是一种灵敏度高、特异性好、不需标记、操作简单、省时、能重复使用和实时在线检测AFP的新方法,对比实验表明其检测结果准确,能用于临床实验诊断,具有临床推广价值。

关键词:压电;传感器,免疫;甲胎蛋白
中图法分类号:R312;R446.61;R73-3 文献标识码:A

Experimental study of alpha fetoprotein piezoelectric quartz crystal immunosensor

ZHANG Bo, FU Wei-ling, MAO Qiong-guo, CHEN Qing-hai, JIANG Tian-lun, ZHANG Xue, CHEN Ming, TANG Wan-li, YU Fan (Department of Laboratory, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To construct a new type of alpha fetoprotein (AFP) piezoelectric quartz immunosensor for the determination of human AFP. Methods The sensor detection pools consisted of plastic cycles and the crystals of 10 MHz quartz AT cut with gold coated electrodes. The immobilization of the monoclonal antibody of AFP onto the gold electrode surface of the crystal was accomplished *via* Thiol method. The immunosensors were used in clinical laboratory. Results Experimental results showed that the piezoelectric immunosensor had good response to AFP. The frequency shifts were linearly dependent on AFP concentration in the range of 20—1 000 ng/ml. Other antigens such as carcino embryonic antigen (CEA), prostate specific antigen (PSA), human chorionic gonadotrophin (hCG) did not interfere with the sensor's response. The analytical results given by this approach were in satisfactory agreement with those given by radiometric immunoassay. The correlation coefficient was 0.92. Conclusion Piezoelectric immunosensor for determination of AFP is of high sensitivity, high specificity, unnecessary labelling, simple operation, high analysis speed, low cost, real-time detection and repeated use, *etc*. It may be suitable for the detection of AFP of serum in clinical laboratory.

Key words: piezoelectricity; immunosensor; alpha fetoprotein

甲胎蛋白(Alpha fetoprotein, AFP)是胚胎发育早期的一种主要血清蛋白,成人由肝细胞产生,含量极微。血清AFP升高对肝癌有十分重要的诊断价值,是诊断原发性肝癌的重要指标之一[1,2]。目前AFP的临床检测方法有放射对流免疫法(RCIEP)、放射免疫测定法(RIA)、酶联免疫吸附分析法(ELISA)等[3,4]。这些方法大多需要对抗体或抗原进行放射标记或酶标记,操作繁琐,耗时,检测成本较高。压电石英免疫传感器是一种以石英晶体为换能器的新型生物传感器件,其振荡频率对晶体表面质量负载的微小变化非常敏感,具有亚ng的质量检测能力,良好的响应性能和较高的检测灵敏度使其近年来获得了迅速的发展,成为免疫传感器的研究热点之一[5,6]。本研究以Sulfosuccinimidyl 6-[3′-(2-pyridyldithio) propionamido] hexanoate (Sulfo-LC-SPDP)巯基化固定法制备抗人AFP抗体识别敏感膜,构建了一

基金项目:国家"九五"科技攻关项目(96-A23-04-04);国家自然科学基金资助面上项目(39870831);国家高技术计划生物技术领域青年基金资助项目("863"项目);全军"九五"医学科研计划资助面上项目(98MO94);全军"十五"医学科研计划资助面上项目(01MA180);全军"十五"医学科研计划指令性课题(01LO65);重庆市科委风险投资基金资助项目

作者简介:张 波(1969—),男,四川省安岳县人,博士,主治医师,讲师,主要从事医学实验诊断及生物传感器方面的研究,发表论文15篇。电话:(023)68754429

收稿日期:2003-03-10;修回日期:2003-04-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

种新型的质量效应型 AFP 免疫传感器, 并初步应用于临床标本的检测, 取得了良好的结果。

1　材料与方法

1.1　仪器与器材

石英晶振采用 AT 切型, 双面镀金电极, 基频 10 MHz 的石英晶体, 晶振为 13.0 mm × 13.0 mm 的方片, 金膜电极直径为 4.0 mm, 晶振两面电极的接触点引在晶振的一面。检测池固定夹具具有与晶振尺寸相应的固定槽、电极接触膜及电极导线, 上盖有直径 6.0 mm 的圆孔, 夹具两端用螺丝固定; 池壁为直径 10 mm 的乳胶套圈。频率检测仪采用自激式振荡电路, 频率信号为 TTL 电平输出, 检测室具有恒温、屏蔽、防震装置, 由我室与中国嘉陵集团、信息产业部第 26 研究所共同设计制作。PCL-836 多功能频率记数卡(台湾研发公司产品)内置于方正奔Ⅲ型计算机(北大方正集团公司)。我室自行设计开发的《PE-SA2.0 频率采集分析软件》具有频率记数、差值显示、频率变化趋势图显示等功能。

1.2　主要试剂

抗人 AFP 单克隆抗体购自美国 Biodesign 公司(浓度为 3.0 mg/ml, PBS 溶液 pH 7.0); Sulfosuccinimidyl 6-[3′-(2-pyridyldithio) propionamido] hexanoate(Sulfo-LC-SPDP)为美国 Pierce 公司产品; 人 AFP 标准品采用 ELISA 免疫检测试剂盒的标准品(郑州博赛生物技术公司), 由西南医院检验科张天晓老师惠赠。其他试剂均为 AR 级。

1.3　方法

1.3.1　石英晶体的预处理　　按文献[7]报道的方法进行。氮气吹干后备用。

1.3.2　压电石英晶体传感器检测池的组装　　把石英晶振放入金属夹具的晶振固定槽中, 电极接触点向下放置与外接电极接触, 抗体固定面向上, 置入乳胶套圈和带金属的固定橡胶条, 套上夹具上盖, 旋紧固定螺钉, 组装成压电石英晶体传感器检测池; 外接电极与频率检测仪检测接口连接。

1.3.3　抗体的巯基化固定方法　　抗体溶液 3 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(DTT) 2 μl, 混匀后室温反应 30 min。上述巯基化抗体混合液全部转移至石英晶体金膜电极表面, 均匀涂布, 石英晶体在室温干燥。分别用 0.15 mol/L 的 PBS 缓冲液(pH 7.4)和双蒸水冲洗 3～5 次, 氮气吹干, 4 ℃冰箱保存备用。

1.3.4　检测方法　　检测池置于频率检测仪检测室内, 加入 100 μl 检测缓冲液, 37 ℃平衡片刻, 检测记录液相基频 f_1; 加入 10 μl 不同浓度的 AFP 标准溶液, 继续检测 60 min, 记录频率 f_2, 频率偏移值 $\Delta f = f_1 - f_2$。标准曲线每个浓度点重复 3 次。并检测 CEA、hCG、PSA 等对免疫传感器的响应, 观察传感器的非特异反应特性。

1.3.5　血清 AFP 的检测　　方法同上。以 PBS(pH 7.2)作为检测缓冲液, 血清 AFP 浓度超过 1 000 ng/ml 时, 需稀释后检测, 共检测 68 例标本。

1.4　统计学分析

采用 SPSS10.0 统计分析软件进行 t 检验和相关分析。

2　结果

2.1　抗体工作浓度的选择

为了探讨巯基化法固定抗体时抗体的最适工作浓度, 把浓度为 3.0 mg/ml 的抗体稀释成不同浓度的工作液。观察抗体浓度与抗体固定量的关系。结果表明巯基化固定抗体的量与抗体工作浓度密切相关, 见图 1。从图中看出, 抗体的固定量随浓度的增加而增大, 在抗体浓度达到 3.0 mg/ml 时, 抗体的固定量最大。因购买的抗体浓度最高为 3.0 mg/ml, 无法观察更高浓度。因此, 巯基化法固定 AFP 抗体, 抗体工作浓度选择 3.0 mg/ml, 以下实验均采用这一浓度。

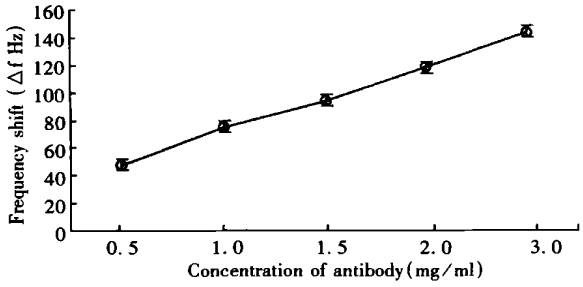


图 1　巯基化法固定抗体量与抗体浓度的关系

Fig 1　Relationship between the concentrations of anti-insulin antibody and frequency shifts of quartz crystals

2.2　压电 AFP 免疫传感器的响应特性

2.2.1　温度对传感器的影响　　结果与文献[7]报道相符。在 37 ℃时, 抗原抗体反应后频率响应最大。当温度再升高时, 频率响应却反而迅速减小。

2.2.2　抗原-抗体反应时间对传感器的影响　　用制备好的压电免疫传感器检测 AFP 标准品, 在 37 ℃条件下观察晶体振荡频率随抗原-抗体反应时间的变化规律, 见图 2。结果显示, 抗原抗体反应在 40 min 后, 频率达到稳定, 继续检测, 频率降低已不显著。表明抗原抗体反应已基本达到平衡, 免疫反应基本完成, 再延长反应时间, 晶体表面质量负载也无明显变化, 频率达到稳定。因此, 实验选择 40 min 作为检测 AFP 的反应时间。

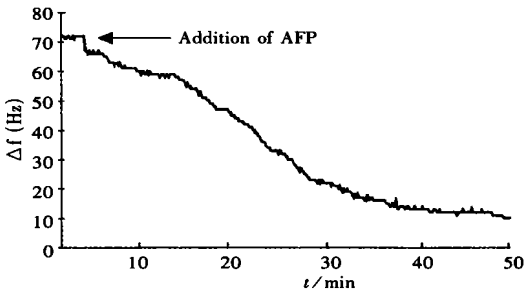


图 2　压电 AFP 免疫传感器频率随时间变化的趋势图

Fig 2　Tendency of frequency change with time of piezoelectric AFP immunosensor

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.2.3 压电AFP免疫传感器检测方法的特异性 用压电AFP免疫传感器检测hCG、CEA、PSA高浓度标准溶液，上述条件反应40 min后，检测hCG、CEA、PSA所致传感器的非特异性频率响应值分别是(11.2±2.4)、(14.6±3.5)、(11.2±3.1) Hz。结果表明，上述物质引起的传感器频率响应均在传感器的噪音范围内[(13.8±3.6) Hz]，对AFP的检测基本无干扰。可见，该传感器的选择性较好，特异性高，能满足临床检测的要求。

2.3 压电AFP免疫传感器检测标准曲线的制作

压电传感器在AFP各浓度点的频率变化值($\Delta f = f_1 - f_2$; f_1为检测液相基频)用3次平行检测结果的平均值表示，并用参考检测值进行校正。以AFP标准溶液的浓度为横坐标，频率变化的绝对值(Δf)为纵坐标作图，得到AFP压电免疫传感器的检测剂量反应曲线，见图3。AFP的浓度在20~1 000 ng/ml范围内，AFP的浓度与传感器频率的变化之间呈良好的线性关系，AFP浓度低于20 ng/ml时，传感器频率的特异性响应信号易被噪声信号淹没，因此，20 ng/ml是传感器的最低检测限。

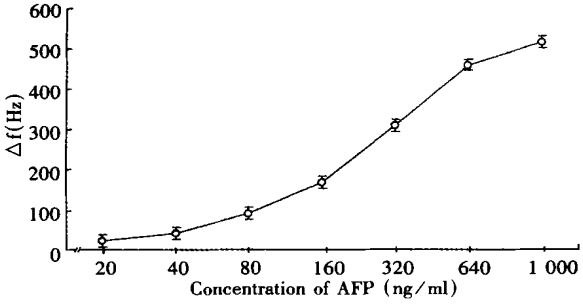


图3 压电石英免疫传感器检测AFP的标准曲线

Fig 3 Normalized response curve of piezoelectric quartz crystal immunosensor to AFP concentrations

2.4 初步临床应用

利用构建的压电AFP免疫传感器检测了68例临床血清标本。同时，采用放射免疫分析法进行平行检测，结果经线性相关分析，两种方法的相关系数为0.92($P<0.01$)，表明本法检测结果与放射免疫分析法高度符合。

2.5 压电AFP免疫传感器的再生

用过的传感器用8.0 mol/L的尿素再生，再用于AFP检测，结果表明传感器仍有良好的相应特性，但响应能力呈逐渐下降趋势。再生5次以后，传感器的响应能力只相当于第1次的70%，下降显著。因此，认为压电免疫传感器可以用尿素再生后重复使用，但再生次数不能多于5次。

3 讨论

临床检测AFP的常用方法有放免法、放射火箭电泳法等方法，但这些方法检测耗时，操作繁琐，^{125}I标记试剂保存时间有限；临床上一般是收集一定数量的标本后，批量检测，导致检测周期长，降低了临床疾病诊断治疗的效率；特别是标记同位素对人体和环境造成损害和污染[8]。急需寻找一种操作简单，成本低廉、检测周期短，环保的新方法。

生物传感器是一种操作简便、结果准确、检测快速的新型分析检测手段，近年来获得了快速的发展，已广泛应用于生物医药、环境监测、食品卫生检验等领域。压电免疫传感器是利用石英晶体作为换能器件，把免疫反应的生物学信号转换成易于观察和检测的频率电信号。其工作的基础是Sauerbrey推导的质量-频偏方程：$\Delta f = -K\Delta m$，因此通过检测频率的变化就能反映晶体表面微小的质量变化[8]。压电谐振测量技术具有亚ng级的质量检测能力，不需标记，操作简单，能快速在线实时检测，采用单克隆抗体，大大提高了传感器的检测特异性，有望取代放免和酶免分析技术，成为未来临床大规模使用的检测新手段。

本实验研制的压电AFP免疫传感器，采用巯基化分子自组装技术，利用Sulfo-LC-SPDP使抗体分子连接上一个活性-SH，石英晶体金膜电极的Au与活性S原子有强烈的键合作用，这是一个放热过程，从热力学角度分析它有利于膜的形成，使吸附分子尽可能多地与金膜表面键合而达到最紧密的排列，形成一层空间排布一致、紧密有序的抗体单分子层。Sulfo-LC-SPDP巯基化抗体的抗体分子和巯基之间有一较长的空间臂，使固定后抗体分子与金膜之间的距离增大，有效的克服了抗原-抗体反应时的空间位阻[8]。该方法固定抗体量大、一致性好，抗体膜的生物活性比其它方法高(有关数据另文发表)，非特异反应少。由于单位面积上抗体固定量大，提高了传感器的检测灵敏度。因此，巯基化分子自组装技术是目前一种理想的抗体固定方法[9]。

制作的压电AFP免疫传感器检测标准曲线显示，AFP浓度在20~1 000 ng/ml范围内，传感器频率变化与AFP的浓度呈良好的线性关系，表明传感器有良好的响应特性。当AFP浓度低于20 ng/ml时，传感器频率响应信号弱，容易被噪声信号淹没。因此可以得出，该方法的检测线性范围为20~1 000 ng/ml，与放免分析法的检测范围相当。目前临床上血清AFP浓度的临床判断域值是20 ng/ml，低于20 ng/ml，血清AFP浓度视为正常，而压电传感器检测20 ng/ml AFP的对应频率响应值为25 Hz，故25 Hz可作为压电AFP免疫传感器检测AFP的临床判断域值。同时用研制的传感器检测hCG、CEA、PSA高浓度标准溶液，频率变化在噪声范围内，传感器基本无响应，表明传感器检测特异性高。压电AFP免疫传感器应用于68例临床标本的检测，其结果与放免法比较，相关系数为0.92($P<0.01$)，两种方法的检测结果有显著相关性。提示压电AFP免疫传感器能用于AFP的定量检测。本研究采

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

用尿素作为解离剂进行传感器再生，尿素可以使结合的抗原抗体复合物解离，使抗体的结合位点重新暴露，恢复抗体的生物活性，用于重复检测，但尿素等变性剂可导致抗体的生物活性降低，再生 5 次后，传感器的响应能力仅为原来的 70%，因此传感器再生次数不超过 5 次为宜。压电 AFP 免疫传感器能重复使用，与放免法相比，检测成本降低，其实用性大大增加。

综上所述，压电 AFP 免疫传感器具有不需标记，操作过程简单，加入标本后不需加入任何试剂；灵敏度高，与放射免疫分析技术的灵敏度相当；检测时间短，仅需 40 min 左右，比放免法的检测时间大大缩短；更重要的是该方法不需同位素标记，避免了放免法标记同位素的繁琐操作过程和放射性对人体、环境的损害和污染；能重复使用，降低了检测成本等优点。因此，压电 AFP 免疫传感器是一种灵敏、特异、环保的分析新方法，在临床 AFP 检测方面具有一定的优势，有望在临床推广应用。

参考文献：

[1] Helmut W, Felix G, Frank B, *et al*. Prospective evaluation of circulating hepatocytes by alpha fetoprotein messenger RNA in patients with hepatocellular carcinoma[J]. Surgery, 2002, 131(1): 34－41.

[2] Gillespie J R, Uversky V N. Structure and function of alpha-fetoprotein: a biophysical overvie[J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1480(1－2): 41－56.

[3] 王力平，庄惠程，黄开盛. EIA 法与 RIA 法检测甲胎蛋白结果比较[J]. 标记免疫分析与临床，1999，6(1)：51－53.

[4] Ilkka H, VeliMatti M. Time-resolution in fluorometry technologies, labels, and applications in bioanalytical assays[J]. Crit Rev Clin Lab Sci, 2001, 38(6): 441－447.

[5] Vaughan R D, O'Sullivan C K, Guilbault G G. Development of a quartz crystal microbalance (QCM) immunosensor for the detection of listeria monocytogenes[J]. Enzyme Microb Technol, 2001, 29(10): 635－638.

[6] Jan H, Maria H, Petr S. Investigation of highly sensitive piezoelectric immunosensors for 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2001, 16(4－5): 253－260.

[7] 张 波，府伟灵，蒋天伦，等. 压电石英晶体微阵列免疫传感器检测 hCG 的实验研究[J]. 第三军医大学学报，2002，24(1)：35－38.

[8] 姜雄平，许丹科，马立人. 金自组膜固定生物分子技术在核酸及免疫传感器中的应用[J]. 解放军药学学报，2001，17(5)：262－264.

[9] Chaki N K, Vijayamohanan K. Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2002, 17(1－2): 1－12.

（编辑 王 红）

文章编号：1000-5404(2003)13-1177-01

个案与短篇

重组人细胞因子对离体培养的绒毛组织产生β-hCG 的影响

Effects of recombinant human cytokine on β-hCG production in cultured villi *in vitro*

章 容，于冬梅，麻 莉 （第三军医大学附属西南医院病理学研究所，重庆 400038）

近年来，有研究显示，妊娠中晚期妇女体内 hCG 水平异常升高与宫内感染等不良妊娠结局有关[1]。本研究通过观察外源性细胞因子 IL-1、IL-6、TNFα 对离体培养的晚孕期绒毛组织产生β-hCG 的影响，探讨细胞因子与β-hCG 水平改变的关系。

1 材料与方法

1.1 绒毛组织培养

选择足月妊娠选择性剖腹产的孕妇胎盘，选取 3～5 个胎盘小叶，用无菌生理盐水充分漂洗，去除其中的血管和蜕膜，将绒毛组织分割成 5～10 mg 的小片，在 D-Hanks 液中冲洗 2 遍，然后将 5 片放入 24 孔板中，每孔加入 1 ml RPMI1640 培养液，置培养箱中 37 ℃，5%CO_2，相对湿度 90%条件下孵育 24 h。

1.2 外源性细胞因子处理培养的绒毛组织

重组人白细胞介素 1 (rhIL-1)、重组人白细胞介素 6(rhIL-6)、重组人肿瘤坏死因子 α(rhTNFα，邦定公司)：分别溶于无血清培养基，稀释成所需不同浓度，－20 ℃备用。绒毛组织培养 24 h 后，更换培养液，分组培养：每组 6 孔，对照组(未加处理因素)，rhIL-1 处理组(10^5、10^4、10^3、10^2 U/ml，每种浓度各 6 孔)，rhIL-6 处理组(10^5、10^4、10^3、10^2 U/ml，每种浓度各 6 孔)，rhTNFα 处理组(10^5、10^4、10^3、10^2 U/ml，每种浓度各 6 孔)，继续培养 24 h。

1.3 放射免疫法测定培养绒毛组织上清液中β-hCG 含量

吸出各孔中的培养液，离心 1 500 r/min，取上清液，以放免法用 FJ-2008G 自动 γ 免疫计数器(西安 262 厂)测定其中的β-hCG 含量。

（下转 1180 页）

作者简介：章 容(1974－)，女，重庆市长寿县人，技师，主要从事病理学技术方面的研究。电话：(023)68754000－73107

收稿日期：2003-01-15；修回日期：2003-03-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net