DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.12.029
第24卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 12
2002年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2002

文章编号:1000-5404(2002)12-1439-04

论著

压电C肽免疫传感器的实验研究

张 波[1],府伟灵[1],毛琼国[2],汤万里[3],俞 凡[4] ([1]第三军医大学附属西南医院检验科,[2]第三军医大学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C肽免疫传感器。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形成检测池,抗人C肽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C肽免疫传感器。结果 构建的压电C肽免疫传感器对C肽的响应特性良好,其线性检测范围为0.375~12.0ng/ml,胰岛素、胰岛素原对C肽的检测基本无干扰,传感器可再生后重复使用5次;58例临床标本检测结果与放射免疫检测法符合($P>0.05$),两种方法的相关系数为0.94。结论 研制的压电C肽免疫传感器具有灵敏度高、特异性好、不需标记、操作简单、省时、能实时在线检测和重复使用等优点,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;C肽
中图法分类号:R392-33;R446.6 文献标识码:A

Experimental study of C-peptide piezoelectric immunosensor

ZHANG Bo, FU Wei-ling, Mao Qiong-guo, TANG Wan-li, YU Fan (Department of Laboratory Medicine, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To construct a new type of C-peptide piezoelectric immunosensor to determine human C-peptide. **Methods** The sensor pool consisted of a plastic cycle and 10 MHz-quartz AT-cut crystal with gold coated electrodes on it. The immobilization of the monoclonal antibody of C-peptide onto the gold electrode surface of the crystal was accomplished via thiolated method. The immunosensor were used in clinical laboratory. **Results** Experimental results showed that the piezoelectric immunosensor had good response to C-peptide with frequency shifts linearly dependent on C-peptide concentration in a range of 0.375-12 000 ng/ml. Other antigens such as insulin and proinsulin did not intervene with the response of the sensor. The analytical results by this approach were in satisfactory consistence with those from radiometric immunoassay ($P>0.05$), in a correlation coefficient of 0.94. **Conclusion** Piezoelectric immunosensor for determining C-peptide is a small in size, low in cost, simple and rapid in operation device, in addition, of high sensitivity, high specificity, and unnecessary labeling for real-time detection. Thus, it is suitable for detecting serum C-peptide in clinical laboratory.

Key words: piezoelectricity; immunosensor; C-peptide

C肽是胰岛素原加工成胰岛素的过程中,分解出的一条含31个氨基酸残基的连接肽[1]。胰岛细胞在分泌胰岛素的同时也释放等分子的C肽,由于C肽在血清中很少被肝脏代谢,且C肽分子的氨基酸组成存在相当大的动物种属差异,尤其在糖尿病用胰岛素治疗时,药用胰岛素不含有C肽,无免疫交叉反应。因此,血清C肽浓度更能确切地标志胰岛β细胞功能,被认为是反映胰岛β细胞合成和分泌胰岛素功能的最佳指标[2]。目前C肽的临床检测方法有放射免疫测定法(RIA)、酶联免疫测定法(ELISA)、磁分离免疫测定法(MAIA)等[3,4]。上述方法需要对抗体或抗原进行放射性标记或酶标记,操作繁琐,检测成本高,标记同位素对工作人员和环境存在损害或污染。压电免疫传感检测技术是一种灵敏度高、特异性好、能实时在线检测的分析手段,具有操作简单、不需标记、检测快速等优点,近年来获得了迅速的发展,成为免疫传感器研究的热点之一[5]。本研究利用Sulfosuccinimidyl 6-[3′-(2-pyridyldithio)propionamido] hexanoate (Sulfo-LC-SPDP)把抗人C肽的单克隆抗体巯基化,巯基化的抗体通过分子自组装定向固定在石英晶体金膜表面,构建了一种新的质量效应型C肽免疫传感器,取得了满意的结果。

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。由我室和中国嘉陵集团合作研制。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。PCL-836多功能频率记数卡(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)。

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(98M064);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(01LO065);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,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事医学实验诊断及相关新技术、新仪器方面的研究,发表论文12篇。电话:(023)68754429
收稿日期:2002-04-02;修回日期:2002-08-15

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

《PESA 频率采集分析软件 2.0》具有频率记录、差值显示、频率变化趋势图显示等功能。由我室与信息产业部第 26 研究所共同设计制作。

1.2 主要试剂

抗人 C 肽单克隆抗体购自美国 Biodesign 公司(浓度为 2.3 mg/ml, PBS 溶液 pH7.0); Sulfosuccinimidyl6-[3′-(2-pyridyldithio) propionamido] hexanoate(Sulfo-LC-SPDP)美国 Pierce 公司产品; C 肽标准品采用放射免疫检测试剂盒的标准品(北京 中国原子能科学研究院),由西南医院核医学科冯华芳老师惠赠。其它试剂均为 AR 级。

1.3 方法

1.3.1 石英晶体的预处理 按文献[6]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的银膜电极接触,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 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。

1.3.4 抗体分子的定向自组装 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。

1.3.5 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 F1;加入 10 μl 不同浓度的 C 肽标准溶液或血清样品,继续检测 40 min,记录频率 F2,频率偏移值 ΔF= F1−F2。标准曲线每个浓度点重复 3 次。

1.3.6 压电免疫传感器的再生 检测使用过的压电免疫传感器,加入 8.0 mol/L 的尿素溶液 80 μl,反应 5 min,用 pH 7.0 的 PBS 缓冲液反复冲洗 5 次,再用于下一次检测。

1.4 统计学分析

本方法检测结果与放射免疫法检测结果采用 SPSS10.0 统计分析软件进行线性回归分析和配对资料 t 检验。

2 结果

2.1 抗体工作浓度的选择

抗体经巯基化后,连接上一个活性巯基(-SH),巯基的 S 原子与 Au 表面强烈相互作用,形成稳定的 Au-S 化合键,使抗体牢固地固定在金膜电极表面,固定量以抗体固定前后晶体频率的变化(Δf= f0−f1 f1 为抗体固定后的气相频率)表示。为了探讨巯基化抗体自组装法抗体的最适工作浓度,把 2.3 mg/ml 的抗体稀释成不同浓度的工作溶液,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 2.3 mg/ml 时,抗体的固定量最大。因购买的抗体浓度最高为 2.3 mg/ml,无法观察更高浓度。因此,巯基化法固定 C 肽抗体,抗体工作浓度选择 2.3 mg/ml,以下实验均采用这一浓度。

2.2 压电 C 肽免疫传感器的响应特性

2.2.1 温度对传感器的影响 温度影响免疫反应的速度。实验发现,在 10℃~30℃之间,相同时间内晶体频率变化随温度变化较小,表明免疫反应速度缓慢。随温度继续升高,频率变化迅速增大,在 37℃时,频率响应最大。当温度再升高时,频率响应却反而迅速减小。这可能与较高温度使抗原抗体反应的解离反应速率加快和抗体失活有关,符合传统的免疫反应理论[7]。

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 C 肽标准品,在 37℃条件下观察抗原抗体不同反应时间对应晶体振荡频率的变化,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 C 肽样品的反应时间。

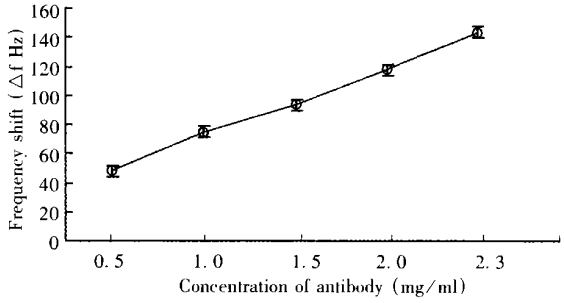


图 1 巯基化法固定抗体量与抗体浓度的关系

Fig 1 Relationship between the concentrations of monoclonal antibody against C-peptide and frequency shifts of the crystal

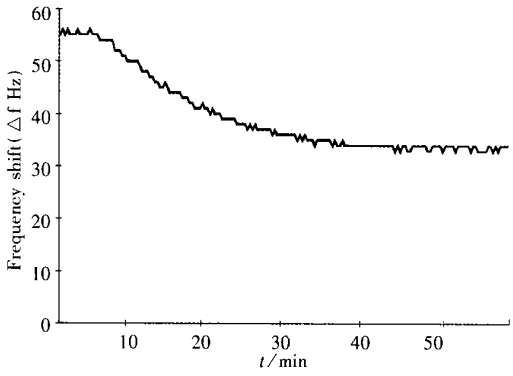


图 2 压电 C 肽免疫传感器频率随时间变化的趋势

Fig 2 Trendline of the frequency shifts of the C-peptide piezoelectric immunosensor along with time elapsing

2.2.3 压电 C 肽免疫传感器检测方法的特异性 用 C 肽免疫传感器检测胰岛素、胰岛素原的标准溶液,上述条件反应 40 min 后,检测反应前后的频率变化值,见表 1。这些物质引起的频率变化均在传感器的噪音范围内,对 C 肽的检测基本无干扰。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 C 肽免疫传感器检测标准曲线的制作

C 肽各浓度点的压电传感器频率变化值(ΔF = F1−F2; F1 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 C 肽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 C 肽压电免疫传感器的检

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

测剂量反应曲线, 见图 3。从图中可以看出, C 肽的浓度在 0.375~12.0 ng/ml 范围内, C 肽的浓度与传感器频率的变化之间呈良好的线性关系, C 肽浓度低于 0.375 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, 0.375 ng/ml 是传感器的最低检测限。

表 1　压电 C 肽免疫传感器对胰岛素和胰岛素原的响应特性

Tab 1　Responses of C-peptide piezoelectric immunosensor to insulin and proinsulin

Antigens	Insulin	Preinsulin	Blank
Frequency Shift * (Hz)	8±3	10±3.5	15<

* Caused by the antigens of upper limit concentration.

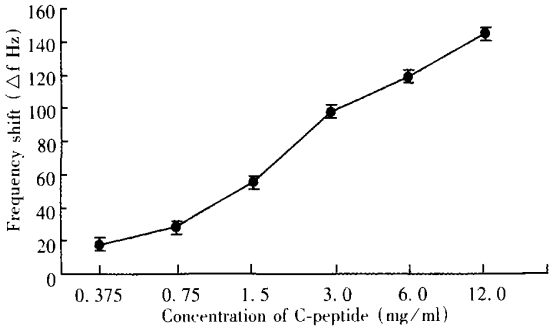


图 3　压电 C 肽免疫传感器检测标准曲线

Fig 3　Standardized curve of the frequency shifts of piezoelectric immunosensor to concentration of C-peptide

2.4　初步临床应用

利用构建的压电 C 肽免疫传感器检测了 58 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 0.94, 表明本法检测结果与放射免疫分析法高度符合($P>0.05$)。

2.5　压电 C 肽免疫传感器的再生

使用过的传感器用尿素再生, 再用于检测, 结果表明传感器仍有良好的响应特性, 但响应能力逐渐下降。再生 5 次后, 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

生物传感器由于具有操作简便、结果准确、检测速度快等特点, 近年来获得了快速的发展[8]。本研究构建的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[9]。压电谐振测量技术具有 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手段。

临床常用的 C 肽检测方法是放免法, 其检测耗时, 操作繁琐, ^{125}I 标记试剂保存时间有限; 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。急需寻找一种操作简单, 检测周期短的新方法。

本实验构建的压电 C 肽免疫传感器, 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。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), 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固定抗体是一种理想的抗体固定方法[10]。

制作的压电 C 肽免疫传感器检测标准曲线显示, C 肽浓度在 0.375~12.0 ng/ml 范围内, 传感器频率变化与 C 肽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 C 肽浓度低于 0.375 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 0.375~12.0 ng/ml, 与放免分析法的检测范围相当。同时用研制的传感器检测胰岛素、胰岛素原标准溶液, 传感器基本无响应, 表明传感器检测特异性高。压电 C 肽免疫传感器应用于 58 例临床标本的检测, 其结果与放免法比较, 相关系数为 0.94, 两种方法的检测结果无显著性差异。提示压电 C 肽免疫传感器能用于 C 肽的定量检测。本研究采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 C 肽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 C 肽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; 检测时间短, 仅需 40 min 左右, 比放免法的时间大大缩短; 更重要的是避免了放免法标记同位素对人体和环境的损害和污染; 能重复使用等优点。因此, 压电 C 肽免疫传感器在临床 C 肽检测方面具有一定的优势, 其应用前景广阔, 具有临床推广价值。

参考文献:

[1] 刘冬梅, 林丽香. C 肽在糖尿病中的应用及前景[J]. 国外医学: 内分泌学分册, 1999, 19(1): 33—35.

[2] Wright P R, Mills J, Choo K E, *et al*. The role of C-peptide in the classification of diabetes mellitus[J]. West Indian Med J, 2000, 49(2): 138—42.

[3] Stickle D F, McNeil S E. Evaluation of use of singleton measurements of C-peptide by RIA[J]. Clin Chim Acta, 1999, 1283(1—2): 195—200

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

[4] 冯 婷, 崔毓桂, 狄福松, 等. 磁性分离酶联免疫测定技术在糖尿病的临床应用[J]. 南京医科大学学报, 1999, 19(4): 281—283.
[5] 姚守拙. 压电生物传感[J]. 生命科学研究, 1998, 2(1): 1—5.
[6] Park I S, Kim N. Thiolated Salmonella antibody immobilization onto the gold surface of piezoelectric crystal[J]. Biosens Bioelectron, 1998, 13(10): 1 091—1 097.
[7] 陶其敏. 免疫学和免疫学检验[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1989. 71—73.
[8] 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.
[9] 张波, 府伟灵. 压电石英晶体生物传感器及其应用[J]. 生物技术通讯, 2002, 13(2): S20—S24.
[10] Su X D, Chew F T, Li S F. Self—assembled monolayer-based piezoelectric crystal immunosensor for the quantification of total human immunoglobulin E[J]. Analytical Biochem, 1999, 273(1): 76—72.

(编辑 王 红)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2002)12-1442-01

518 例风湿性关节炎的中医辨证施护

Nursing for 518 cases of rheumatic arthritis with traditional Chinese medicine regimen

李祯英, 况 艺 (第三军医大学附属西南医院中医·风湿科, 重庆 400038)

广义的风湿性关节炎包括许多病种(如风湿热、类风湿性关节炎、骨关节炎、强直性脊椎炎、红斑狼疮等)[1]。是病程迁延, 反复发作的慢性疾病。属中医痹证范畴。病因为风、寒、湿、热等外邪侵袭关节筋骨, 闭阻经络, 气血运行不畅所致, 但如迁延难愈者常有正气不足、营卫失调, 内脏功能受损的内因。我科自 1998 年 1 月至 2000 年 1 月收治本病 518 例。通过对病因病机、临床表现及舌脉等资料的分析, 将其分为行痹、痛痹、着痹、风湿热痹及痰瘀痹阻等五种类型。按型分别进行辨证施护, 取得了较好的效果。现报道辨证施护经验。

1 行痹

风邪入侵肌肤关节所致。起病较快, 关节肌肉酸痛, 游走不定, 局部无红肿。皮温皮色正常, 关节屈伸不利, 在急性发作时可有发热恶风, 舌苔薄白、脉浮等表症现象。在疾病初期如有表症, 可适当服生姜糖茶、生姜粥或葱白粥有助祛除风邪、调和营卫。由于风邪善行数变, 其性开泄, 除关节游走性疼痛外, 尚有毛孔开泄, 多汗恶风, 故病室内宜温暖忌直接吹风, 出汗后及时用干毛巾擦干, 以防外邪再次入侵。中医认为治风先治血, 血行风自灭, 可采取中药液离子透入理疗以助疏通经络、运行气血、调和营卫、增强祛除风邪的效果(中药配方: 防风、防已、桑枝、秦艽、清风藤等)。饮食宜清淡而富有营养, 不宜过食辛热油腻食物, 以免助邪化热。

2 痛痹

寒邪入侵, 经络为寒邪阻遏, 气血不通, 关节因而疼痛。痛处固定, 比较剧烈, 遇冷加重, 得热稍减。寒主收引, 关节肌肉及肌腱拘挛。关节多无红肿、皮温皮色正常。舌苔白、脉弦紧。护理注意保暖, 少下冷水, 被褥衣着宜干燥松软。因痛痹喜温, 以温经散寒和络为主, 局部可用热性膏药如伤湿止痛膏、狗皮膏等贴敷。亦可用手温药物如干姜、独活、牛膝、细辛等炒热后乘热纱布包敷患处。中药直流电离子透入治疗亦有较好效果(中药方如干姜、桂枝、芍药、当归、姜黄、羌活等煎水浸湿纱布置电极下通电)。饮食注意营养, 可用干姜、附片炖羊肉汤食用以达到温经散寒之目的。

3 着痹

因湿邪所致。起病较慢, 关节酸痛、沉重、肿胀, 部位固定, 肌肤麻木不仁。关节皮色正常。舌苔白腻, 脉濡缓[1]。护理原则当健脾除湿, 蠲痹通络。注意肿痛关节的休息, 病室宜干燥温暖。脾为运化水湿之脏, 湿邪过盛亦可困脾, 使脾脏功能障碍进一步加重湿邪之害。故饮食方面忌过食油腻生冷及甜食, 以免生湿。平时可煮食苡米粥、赤小豆粥以健脾除湿, 增强治疗效果。中药离子导入治疗亦有助祛邪通络消肿止痛(中药配方: 苍术、威灵仙、防已、桑枝、清风藤煎水, 侵湿电极处纱布通电治疗)。

4 风湿热痹

因风、湿、热邪入侵综合致病。本证有关节疼痛, 局部灼热红肿, 痛不可触, 屈伸不利, 得冷稍减。可兼有发热恶风, 多汗, 心烦口渴。舌苔黄, 舌质红, 脉数。少数病人可侵犯心脏, 须观察心脏表现及脉搏变化。护理时法重清热解毒, 祛风除湿, 活血通络。对关节红肿疼痛剧烈者宜卧床休息, 与行痹相同多汗者避免直接吹风。虽然关节红肿灼热, 喜冷恶热, 但不宜直接低温冷敷, 以免经脉气血凝滞有碍去邪。可用金银花藤煎水常温湿敷, 或用金黄膏, 紫金锭外敷有助清热解毒消肿。食物宜清淡忌辛辣油腻, 以防助长湿热之邪。可常进丝瓜粥, 防风苡米粥(防风、苡米、大米煮粥)有利清热除湿。

5 痰瘀痹阻

痹症日久, 肺脾肾三脏功能失调, 水湿聚而成痰, 血脉阻滞成瘀, 痰瘀交阻加重病情、顽固难愈。关节刺痛, 部位固定, 痛处拒按, 日轻夜重。关节变形周围可见瘀斑或硬结, 肌肤甲错。舌质紫暗或有瘀斑, 舌苔白或黄, 脉涩。护理上除采用上述各型办法之外, 还须健脾益气, 补益肝肾, 活血化瘀。对关节活动障碍畸形者按摩肢体或被动运动, 以疏通经络防止肌肉萎缩。适当理疗争取改善功能。

(致谢: 承蒙洪多伦教授审阅、指导, 特此致谢!)
关键词: 痹证; 关节炎; 辨证施护
中图法分类号: R248 文献标识码: B

参考文献:

[1] 第一军大学中医系内科教研室 主编. 中医内科学[M]. 广州: 广州出版社, 1983. 99—100.

(编辑 郭建秀)

作者简介: 李祯英(1965—), 女, 重庆市人, 主管护师, 主要从事临床护理方面的研究。电话: (023)65321368

收稿日期: 2002-08-15; 修回日期: 2002-10-20

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