

无标记免疫分析

——表面等离子体共振检测方法研究

李子颖¹, 刘一兵¹, 韩世泉¹, 许文革¹, 崔大付², 李辉², 王于杰²

(1. 中国原子能科学研究院 同位素研究所, 北京 102413;

2. 中国科学院 电子学研究所 传感技术国家重点实验室, 北京 100080)

摘要:利用表面等离子体共振生物传感器对磺胺嘧啶及磺胺二甲嘧啶进行快速无标记检测研究, 优化反应条件。抗原固定缓冲液 pH 为 4.2~4.8; 抗体浓度为 1:100~1:200 倍稀释; 再生液为 0.1 mol/L H_3PO_4 溶液, 再生时间为 1.5 min。研究建立了标准曲线, 并对芯片的稳定性进行了考察。

关键词:表面等离子体共振; 磺胺嘧啶; 磺胺二甲嘧啶

中图分类号: R978.2

文献标志码: A

文章编号: 1000-6931(2009)02-0108-05

No-Labeled Immunoassay by Using Surface Plasmon Resonance Biosensor

LI Zi-ying¹, LIU Yi-bing¹, HAN Shi-quan¹, XU Wen-ge¹,

CUI Da-fu², LI Hui², WANG Yu-jie²

(1. *China Institute of Atomic Energy, P. O. Box 275-39, Beijing 102413, China;*

2. *State Key Laboratory of Transducer Technology, Institute of Electronics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China*)

Abstract: Surface plasmon resonance biosensor was used to develop fast no-labeled immunoassays for sulfamethazine and sulfadiazine. The immobilization conditions of the antigen were studied and the working concentration of antibody and the condition of regeneration were optimized. Standard curves were set up and the stability of the chip was studied.

Key words: surface plasmon resonance; sulfamethazine; sulfadiazine

表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)这种物理光学现象在 20 世纪初被 Wood 发现。20 世纪 80 年代, 瑞典科学家 Liedberg 将这一技术用于生物大分子相互作用的检测^[1], 研制开发了 SPR 生物传感器。无需借助标记物进行分析的长处使 SPR 生物传感器可广泛用于各类生物体系的测定, 目前已广

泛应用到生物、化学、医学及食品安全与环境监测等领域^[2]。2002 年, Indvk 等^[3]利用 SPR 生物传感器分析技术进行非内源性 R-蛋白结合测试, 自动检测出牛奶、肉类、肝脏等一系列食物中的 V_{B12} 的含量。2003 年, Gerlie^[4]利用 SPR 生物传感器检测沙门氏菌 B、D、E, 此法成功地在 1×10^6 cfu/mL 样品中检出沙门氏菌 53

个。2001年,Shimamura等^[5]利用SPR技术建立了快速检测2,3,7,8-TCDD、多氯联二苯(PCB)和莠去津的方法,其检出限分别为0.1、2.5、5 ng/mL,每个样品只需15 min。2002年,Ferguson等^[6]利用SPR传感器检测牛奶、蜂蜜及肉中链霉素和二双氢链霉素的残留。2005年,McGrath等^[7]报道了多种磺胺类药物残留的SPR表面等离子体共振检测方法,该方法可在5 h内完成对40份肉样品中20余种磺胺类药物同时检测,灵敏度为16.9 ng/kg。本研究利用中国科学院电子学研究所组装的SPR传感器,以实验室现有磺胺类药物的抗原和抗体为对象,对单通道磺胺嘧啶残留检测方法和高通量阵列芯片对磺胺嘧啶及磺胺二甲嘧啶的残留同时检测方法进行初步研究,希望能在免疫分析检测的新方向——无标记免疫分析方面取得一些进展。

1 实验

1.1 仪器与试剂

SPR-2002型生物传感器、高通量图像阵列SPR生化分析仪均为中国科学院电子学研究所自行研制。

磺胺嘧啶衍生物(SDZ-BSA)、磺胺嘧啶抗体及磺胺二甲嘧啶抗体及衍生物(SM₂-BSA)均由本实验室自制;N-羟基丁二酰亚胺(NHS)和乙基[3-(二甲胺基)丙基]碳二亚胺盐酸盐(EDC)购自ACROS公司;其它试剂购自法玛西亚公司和北京化学试剂公司;所有试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1) SPR-2002型生物传感器对磺胺嘧啶的检测

(1) 抗原固定pH。配制pH分别为3.8、4.2、4.6、4.8、5.2、5.4的0.2 mol/L醋酸盐缓冲液。将SDZ-BSA(pH=7.4、0.02 mol/L磷酸缓冲液(PB))与0.2 mol/L醋酸盐缓冲液以1:49混合后以10 μL/min流速通入已活化好的芯片内。

(2) 缓冲液离子强度。将SDZ抗体配制在不同浓度的PB内,以10 μL/min流速通入已固定抗原并封闭的芯片内。

(3) 抗体浓度的选择。将SDZ抗体分别

稀释400、300、200、150、100、50倍,以10 μL/min流速通入反应池与固定的抗原结合,选择合适的抗体浓度。

(4) 洗脱条件。分别以20 μL/min流速通入0.1 mol/L HCl溶液、0.1 mol/L NaOH溶液、0.1 mol/L H₃PO₄溶液,洗脱抗原抗体的结合。

(5) 构建SDZ标准曲线。用PB稀释后的抗体与含有一定浓度(0、0.1、0.3、1、3、10 ng/mL)的SDZ的缓冲液在室温(20℃)下等体积混合5 min后,按随机顺序进行连续以10 μL/min通入芯片表面5 min,用所得相对响应值与对照(标准品为0)的比值对浓度作图,绘制标准曲线。

(6) 引入二抗法构建SDZ标准曲线。在将抗体与标准品混合的同时,加入一定浓度的渝康体结合的第二抗体,然后通入反应池中,反应同样时间,用所得相对响应值与对照的比值对浓度作图,绘制标准曲线。

2) 高通量图像阵列SPR生化分析仪对磺胺嘧啶与磺胺二甲嘧啶同时检测的研究

(1) SDZ-BSA与SM₂-BSA点样浓度的选择。将SDZ-BSA与SM₂-BSA稀释成不同的浓度,取不同浓度的抗原1 μL,并滴加到活化后的芯片表面不同阵列区上,静置反应30 min。洗涤后封闭剩余活化位点。洗涤后装片,通入一定浓度的SDZ、SM₂抗体进行抗原抗体结合反应。

(2) SDZ与SM₂抗体浓度的选择。将固定了抗原的芯片装片后,通入不同浓度的SDZ、SM₂抗体,记录实时响应曲线。选择最佳抗体浓度。

(3) SDZ与SM₂的标准曲线绘制。用PB稀释后的抗体与含有一定浓度(0、0.1、1、10、100、1 000 ng/mL)磺胺类药物的缓冲液在室温(20℃)下等体积混合5 min后,按随机顺序进行连续以10 μL/min速率通入芯片表面5 min,用所得相对响应值与对照(标准品为0)的比值对浓度作图,绘制标准曲线。

(4) 芯片稳定性测试。在6阵列芯片的不同区域上点上不同浓度的抗原,固定并封闭后,将一定浓度的抗体连续10次通入反应池中,记录芯片的10次响应信号,计算变异系数。

2 结果与讨论

2.1 缓冲液 pH 对抗原固定的影响

当抗原固定用的缓冲液 pH 不同时,芯片所能达到的最大固定量是不同的。实验考察了不同 pH 的醋酸缓冲液在一定时间的固定效果(表 1)。由表 1 可见,当 pH 为 4.2~4.8 时,抗原抗体结合所引起仪器响应信号变化相对响应值(仪器响应单位为 RU)均较高。当 pH 增大至 4.8 后,SPR 响应值明显下降。为此,选择 pH=4.2~4.8 的醋酸缓冲液作为抗原固定的工作溶液。

表 1 抗原固定 pH 条件选择

Table 1 Selecting of pH condition for Ag coating

pH	相对响应/RU	pH	相对响应/RU
3.8	52	4.8	374
4.2	317	5.2	183
4.6	443	5.4	62

2.2 缓冲液离子强度的影响

缓冲液浓度对抗原抗体结合影响列于表 2(两次测量)。从表 2 可看出,随缓冲液浓度增加,单位时间内抗原抗体的结合响应值下降,原因可能是离子浓度过高会干扰抗原抗体的结合,结合免疫分析的需要,选择 0.02 mol/L PB 为抗原抗体的工作体系。

表 2 缓冲液浓度对抗原抗体结合影响

Table 2 Effect of buffer concentration

PB 浓度/(mol·L ⁻¹)	抗原抗体结合响应/RU
0.01	403,452
0.02	292,280
0.05	105,153

2.3 抗体浓度对结合的影响

随着抗体浓度增加,SPR 响应值增加(表 3)。当抗体浓度为 1:100~1:150 时,抗原抗体的结合响应值为 350~500 RU,加之曲线噪声波动,此时仅为 5~10 RU,已满足检测要求,所以,抗体浓度选为 1:100~1:150 倍稀释。

2.4 传感片的再生及再生液的选择

实验考察了 0.1 mol/L HCl、NaOH、H₃PO₄ 溶液的再生能力,结果示于图 1。由图 1 可知,0.1 mol/L NaOH 溶液的单次再生能力

最好,但多次再生后易使基线下降,因此,选择较为温和的 0.1 mol/L H₃PO₄ 溶液作为再生液,再生时间 1.5 min。

表 3 不同浓度抗体的结合响应值

Table 3 Data of response at different concentrations of Ab

抗体稀释倍数	结合强度/RU	噪声波动/RU
400	150	5~10
300	200	5~10
200	300	5~10
150	350	5~10
100	500	5~10
50	1 100	5~10

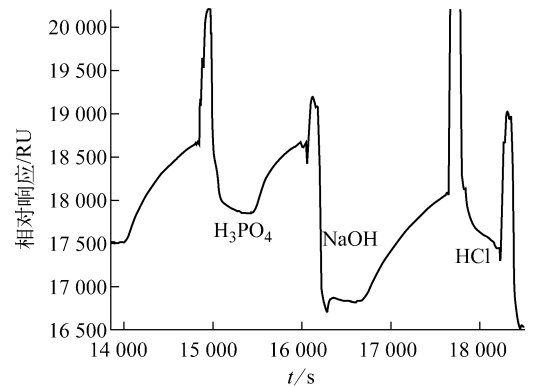


图 1 再生液及再生条件选择

Fig. 1 Effect of different regenerate solutions

2.5 SDZ 标准曲线

将不同浓度 SDZ 与抗体混合后通入反应池反应,实时记录反应响应值。当不添加 SDZ 时,抗原抗体结合响应值为 575 RU。对加入不同浓度 SDZ 时得到的响应数据进行整理,并绘制标准曲线,结果示于图 2。

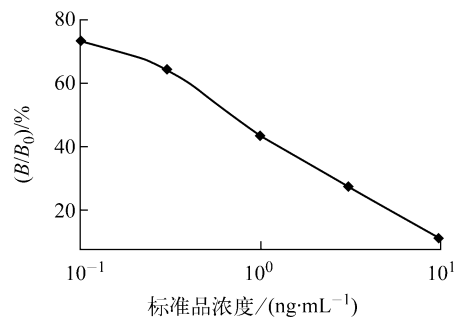


图 2 SDZ 标准曲线

Fig. 2 SDZ standard curve

2.6 引入第二抗体后的 SDZ 标准曲线

根据反应原理可知,谐振角随芯片表面结合的分子的质量改变。为此,本工作在抗原抗体反应的基础上引入能与抗体结合的第二抗体,以增大芯片表面的分子质量,获取更大的谐振角改变,实验结果示于图 3。

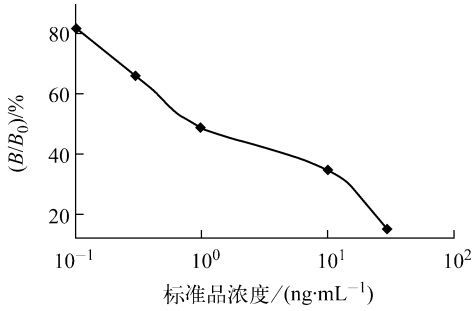


图 3 二抗引入后的 SDZ 标准曲线

Fig. 3 SDZ standard curve after adding second antibody

加入第二抗体之后,当不添加 SDZ 时,抗原抗体的结合响应值由 575 RU 提高至 1 500 RU,响应信号提升了 2 倍,可大幅提高检测的灵敏度,同时也可在此基础上减少抗原抗体的用量。与此同时,从图 3 可看出,曲线的范围有所变宽,当 SDZ 添加浓度为 30 ng/mL 时, B/B_0 方能抑制到 15.2%。

2.7 阵列芯片中 SDZ-BSA 与 SM₂-BSA 固定浓度的选择

分别将 SDZ-BSA(0.04、0.1、0.2、0.4 mg/mL)和 SM₂-BSA(0.05、0.1、0.25、0.5 mg/mL)点到活化后的芯片上,封闭后装片,让一定浓度的抗体流经芯片表面进行抗原抗体反应,实时记录反应响应信号,结果列于表 4。

表 4 SDZ-BSA 和 SM₂-BSA 固定浓度选择

Table 4 Selecting concentration of SDZ-BSA and SM₂-BSA used for coating

SDZ-BSA 固定浓度/ (mg · mL ⁻¹)	相对响应/ RU	SM ₂ -BSA 固定浓度/ (mg · mL ⁻¹)	相对响应/ RU
0.04	316	0.05	543
0.1	388	0.1	663
0.2	373	0.25	647
0.4	401	0.5	948

根据响应信号的大小,选择 SDZ-BSA 固定浓度为 0.2 mg/mL,SM₂-BSA 固定浓度为 0.25 mg/mL。此时的响应信号约为 500 RU,已能满足检测要求。

2.8 SDZ 抗体和 SM₂ 抗体浓度选择

将不同稀释倍数的抗体通过固定有抗原的芯片表面,记录实时响应信号(图 4)。

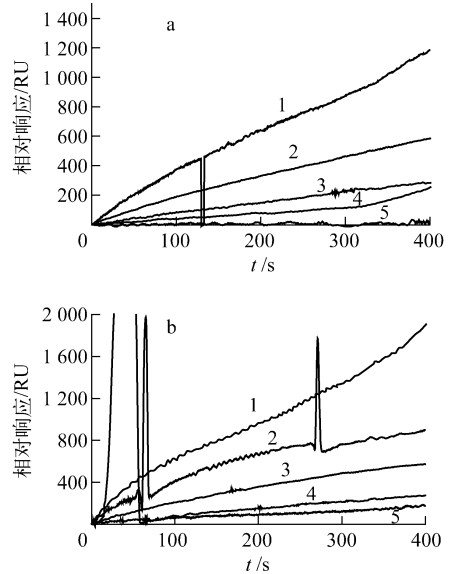


图 4 SDZ(a)和 SM₂(b)抗体浓度选择

Fig. 4 Selecting concentration of SDZ (a) and SM₂(b) antibody

1——1 : 50; 2——1 : 100;
3——1 : 200; 4——1 : 500; 5——1 : 1 000

根据抗原抗体的结合情况,选择 SDZ 抗体 1 : 100 倍稀释,SM₂ 抗体 1 : 200 倍稀释为工作浓度。

2.9 SDZ 与 SM₂ 标准曲线绘制

将 SDZ 抗体与不同浓度的 SDZ 标准品混合,SM₂ 抗体与不同浓度的 SM₂ 标准品混合,然后通入芯片内反应 5 min;记录响应信号,绘制标准曲线(图 5)。

2.10 芯片稳定性考察

固定好抗原的芯片需经反复多次的再生使用,芯片的重复性将会影响到检测的准确性。本工作对芯片不同阵列区域的稳定性进行了连续 10 次的考察,结果列于表 5。由表 5 可知,芯片在 10 次内各区域的变异系数小于 17%,表明芯片基本稳定。

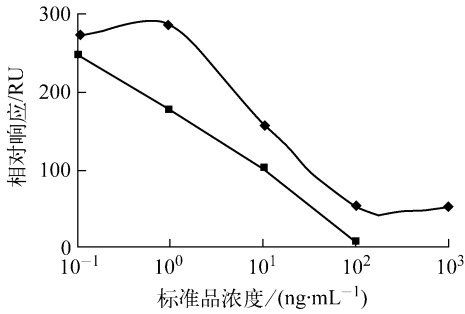
图5 SDZ、SM₂标准曲线Fig. 5 Standard curves of SDZ and SM₂◆—SDZ; ■—SM₂

表5 芯片稳定性考察

Table 5 Stability of sensor chip

阵列区域	10次测量平均 结合强度/RU	标准偏差/ RU	变异系数/ %
1	1 376.36	201.8	14.7
2	1 075.0	97.4	9.1
3	466.6	56.8	12.2
4	132.0	22.2	16.8

3 结语

采用 SPR 生化分析系统对单个样品的检测包括样品结合、冲洗和芯片再生 3 个步骤。样品在反应池中反应 5 min, PB 冲洗 5 min, 再生时间视具体情况 1~5 min 不等, 每个样品的检测耗时小于 15 min, 在单个样品检测方面效率优于 ELISA。由于生物分子未被标记, 始终保持结构完整以及天然活性, 因此, 克服了许多传统方法如 ELISA、RIA 等不能解决的诸如标记蛋白失活、放射性标记物环境污染等, 并大幅减少了工作环节, 检测过程简便, 且易于自动化。采用阵列芯片图像检测系统, 可同时将多种抗原固定于芯片上, 当待测物进入芯片后, 能够进行对多种药物的联合检测, 这是传统的 ELISA 和 RIA 等方法所无法比拟的。随着该方法的不断完善, SPR 无标记检测必将在医学

诊断、药物筛查、食品安全等领域得到广泛应用。

参考文献:

- [1] 杨波, 元秀华, 金四化, 等. 用表面等离子体谐振 (SPR) 技术测试抗原抗体结合反应[J]. 中国医学物理学杂志, 2003, 20(4): 241-242.
YANG Bo, YUAN Xiuhua, JIN Sihua, et al. Test the antigen-antibody binding reaction by the surface plasmon resonance technology[J]. Chinese Journal of Medical Physics, 2003, 20(4): 241-242(in Chinese).
- [2] 程慧, 黄朝峰, 段子渊. SPR 生物传感器及其应用进展[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(5): 46-49.
CHENG Hui, HUANG Zhaofeng, DUAN Zi-yuan. Advances in the application of SPR biosensors[J]. China Biotechnology, 2003, 23(5): 46-49(in Chinese).
- [3] INDVK H E, PERSSON B S, CASELUNG M C, et al. Determination of vitamin B12 in milk products and selected foods by optical biosensor protein-binding assay: Method comparison [J]. J Assoc Off Anal Chem, 2002, 85(1): 72-81.
- [4] GERLIE C. Immunochemical detection of salmonella group B, D and E using an optical surface plasmon resonance biosensor[J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, 222: 197-200.
- [5] SHIMUMUR M, NOMUR Y, ZHANG W, et al. Simple and rapid detection method using surface plasmon resonance for dioxins, poly-chlorinated biphenyls and atrazine[J]. Analytica Chimica Acta, 2001, 434: 223-230.
- [6] FERGUSON J P, BAXTER G A, MCEVOY D G, et al. Detection of streptomycin and dihydrostreptomycin residues in milk, honey and meat samples using an optical biosensor[J]. Analyst, 2002, 127: 951-956.
- [7] McGRATH T, BAXTER A, FERGUSON J, et al. Multi sulfonamide screening in porcine muscle using a surface plasmon resonance biosensor[J]. Analytica Chimica Acta, 2005, 529: 123-127.