

生物传感器在病毒性疾病检测上的应用

丁耀忠, 张杰, 刘永生* (中国农业科学院兰州兽医研究所家畜疫病病原生物学国家重点实验室, 农业部畜禽病毒学重点开放实验室, 农业部兽医公共卫生重点开放实验室, 甘肃兰州 730046)

摘要 就纳米生物传感器、压电生物传感器和一种光纤生物传感器在疾病检测上的最新应用进行综述。

关键词 生物传感器; 疾病; 应用

中图分类号 S854.9 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)01-00153-02

Application of Biosensors in the Detection of Virulent Illness

DING Yao-zhong et al (Key Laboratory of Veterinary Public Health of Ministry of Agriculture, Key Laboratory of Animal Virology of Ministry of Agriculture, State Key Laboratory of Veterinary Biological Biology, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730046)

Abstract This article reviewed the newest application of the nanosensor, piezoelectricity biosensor and one kind of optical fiber biosensor in disease examination.

Key words Biosensor; Disease; Application

病毒是一类比较原始的、有生命特征的、严格细胞内寄生和能够自我复制的非细胞生物, 其种类多, 变异快, 能够引起人类、动物、植物病害。有人认为大多数病毒有严格的寄主, 如乙肝病毒。但是越来越多的证据表明病毒有复杂的寄主, 或者说它的感染面十分广泛, 如禽流感 and 口蹄疫。当一种病毒性疾病暴发时会引起严重的经济损失和社会恐慌, 2003 年的禽流感至少让上百人失掉生命和上千亿美元的损失。为了防止和消灭疾病的蔓延和对人类自身的威胁, 促进经济的健康发展, 科学工作者运用了各种方法用于疾病的防控。目前以基因芯片和生物传感器是研究的热点, 报道和应用已经十分广泛。为此, 笔者就生物传感器在疾病检测上的最新应用进行综述。

1 在人类疾病上应用的免疫生物传感器

1962 年, Clark 设计了一个完整的葡萄糖传感器, 从而打开了生物传感器研究的新局面^[1]。纳米免疫生物传感器是利用纳米粒子的生物兼容性和信号的放大作用, 并结合免疫反应的特异性检测的一类传感器, 但随着技术的完善, 所谓的纳米免疫生物传感器已进脱离了原先的概念。吴永强报道一种检测乙肝 IgM 免疫传感器, 就结合了纳米技术和石英晶体技术。该传感器首先把已经制备好的纳米固定, 与处理好的石英晶体微天平(QCM)的金电极, 在室温下, 以体积比为 100:1 的 PEG/PVA 凝胶溶液修饰金振, 待频率趋于稳定后, 按 1:30 吸取乙肝抗体, 利用凝胶层凝聚力将抗体固定在晶振上, 当频率趋于稳定时加入乙肝核心抗原 Hbc Ag, 同时用未组装纳米金溶胶的晶振作对照试验^[2]。用研制的纳米压电生物传感检测 30 例样本, 结果与 ELISA 检测结果一致, 敏感性良好, 石英晶体处理至少可使用 3 次^[3]。

缪璐等、安海珍等设计了一种 4 通道压电免疫传感器, 滴加乙肝表面抗体溶液制成传感器陈列。在 4 个通道分别滴加血清样品 1、血清样品 2、阳性对照和阴性对照, 抗体在 1~25 μg/ml 内与传感器的响应频率改变值呈良好的线性关

系, 相关系数为 0.997 7。在同样的试验条件下, 对丙肝、梅毒、艾滋 3 种酶联免疫试剂盒中的阳性对照血清进行测定, 其频率改变值与阴性对照血清相差不大, 他们正在进行同步检测 4 种不同病毒的试验^[4-5]。前列腺癌是男性泌尿生殖系统肿瘤中最重要的一种, 其发病原因不明, 发病率在北欧各国占男性癌瘤的第 1 位; 在美国发病率为 14.3%, 仅次于肺癌。据美国癌症协会估计, 2004 年美国约有 230 110 例新发前列腺癌, 29 900 人死于前列腺癌。前列腺特异性抗原 (PSA) 是前列腺腺体和导管细胞分泌的一种蛋白质, 正常时血中含量很少, 一旦患有前列腺癌, PSA 值将升高, PSA 是临床筛选及早期发现前列腺癌 (PCa) 非常有价值的指标^[6]。Lin 等在传统的免疫传感器上提出了用纳米标签免疫色谱电化学传感器检测 PSA, 这种传感器是利用免疫色谱条带和电化学检测器来收集传导的定量信号, 使用 CdSe@ZnS 制成纳米标签作为信号放大的载体。在试验时由高度敏感的溶出伏安法测量金属元件(镉)与一次性丝网印刷电极捕获 NP 标签, 传感器通过“数字的自身价值”评价和分析 PSA 样本(时间、动态范围和重复性), 以 ELISA 为参照, 验证结果显示了高度的一致性, 检测限为 0.02 ng/ml, 相对标准偏差(RSD)为 6.4%^[7]。

2 在动物疾病上应用的压电晶体免疫传感器

压电晶体免疫传感器是质量测量式免疫传感器, 当抗原或抗体与包裹在晶体抗原或抗体结合时, 通过负载频率变化来检测。1972 年, Shons 等首次报道压电现象, 并成功运用与检测^[8]。目前, 这种传感器在病毒的检测上已大量应用, 禽流感呈世界性分布, 在禽群中频繁致病的主要有 H5、H7 和 H9 亚型。其中, H5 亚型禽流感病毒是高致病力禽流感, 严重危害着养禽业, 世界动物卫生组织(OIE)将其列为 A 类传染病, 我国也将其列为一类检疫对象。由于它的传播方式和途径目前尚不明确, 现有的禽流感检测技术(如 ELISA、RT-PCR)难以胜任对高致病性 AIV 快速诊断。刘毅新等使用压电免疫传感器用于禽流感 H5、H9 亚型同步的检测, 在室温下, 采用聚乙烯亚胺(PEI)黏附、戊二醛(Glu)交联固定的方法在 4 个石英晶体银电极表面分别固定 H5、H9(浓度分别为 0.761 0.876 mg/ml)、H1 抗原作为敏感材料。选择 pH 值 7.4

基金项目 兰州市科技计划项目(07-2-12)。

作者简介 丁耀忠(1976-), 男, 甘肃陇西人, 硕士, 从事病毒分子生物学方面的研究。* 通讯作者, E-mail: liuyongshengvip@sina.com。

收稿日期 2008-10-27

的状态下在4个通道上分别滴加禽流感血清样品及阴性对照进行检测,具有选择性较好、特异性高的特点,检测H5、H9浓度范围分别为0.123~0.615、0.123~1.23 ng/ml,线性关系较好,相关系数分别为0.9585、0.9854,能完成禽流感的定性和定量检测^[9]。

口蹄疫(FMD)是由口蹄疫病毒(FMDV)引起的偶蹄动物传染病,人也易感,对畜牧业危害极大。其病原的变异性高,存在7种血清型(O、A、C、AS12A1、SAT1-3)和多种亚型,群内各型同源性达60%~70%,但2群之间同源性仅为25%~40%,血清型间无血清交叉和交叉免疫现象。即使在同一血清型内不同病毒的抗原性亦有变化,到目前已发现62个亚型。由于传统的检测手段存在一些致命的缺陷,所以给防治和消灭口蹄疫带来一系列艰巨而复杂的问题^[10]。印度学者Gajendragad使用压电免疫传感器进行了口蹄疫的诊断和病毒分型,以6 MHz的石英晶体作频率检测元件,口蹄疫病毒特异性抗体与兔单克隆抗体作用包被在晶振表面并测量频率变化,1 μl 10%的临床样本(舌头和脚部上皮细胞)滴加于2个晶体的表面后,频率变化在超过-2.5 Hz时获得了同源性抗原和抗体,可以重复使用8次,在室温下能保存18个星期而性能改变不大。敏感性测试可用于口蹄疫病毒具体类型和无交叉反应之间的口蹄疫病毒类型。与ELISA比较,在病毒分型、阴性样本及混合病毒感染检测上区别不大,但花费的时间远远小于ELISA^[11]。

3 在其他疾病上应用的免疫生物传感器

免疫球蛋白E(IgE)是血清中含量最少的免疫球蛋白,免疫球蛋白在多种细胞活动中均扮演重要角色,这些活动包括细胞的活化、分化甚至凋亡,多种疾病情况下均可见到免疫球蛋白的升高。基于对IgE的检测在疾病的诊断、治疗指导及预后评价具有重要的临床意义。姚春艳等报道了1种检测IgE适配子型压电石英晶体传感器,为了减少试验误差,采用了10个独立的石英晶体检测单元,同时对检测池和参比池进行检测。适配子固定后的石英晶体、BSA溶液封闭晶体清洗吹干后,向各检测单元中加入PBS缓冲液和对应的稀释2倍的标准血清或临床检测标本。收集50例标本,分别用传感器阵列和Access免疫分析仪进行检测比较,其相关系数0.992,检测范围为:2.5~200 μg/L,IgE能被石英晶体特异地结合,频率变化明显(140 Hz,对比参考物质电流频率为20 Hz左右)^[12-13]。

4 一种新型的光纤免疫生物传感器的应用

该类传感器是将光学与光子学技术应用于免疫学,利用抗原、抗体特异结合的性质,将感受到的抗原量或抗体量转换成光学信号进行检测的传感器。一种倏逝波全光纤免疫传感器很具有代表性,利用单多模光纤耦合器结构,激发光的传输和荧光的收集与传输都利用光纤来完成,并利用脉冲半导体激光器作为光源,省去了传统的常规光学系统(如斩光器、二色镜等)。在激发光路上,以半导体脉冲激光器作为光源,激光器发出的激光通过光纤耦合器进入单多模光纤耦合器中的单模光纤,再经单多模光纤耦合器的多模光纤传输进入光纤探头。在收光路中,部分激光被激发经连接器进入多模光纤,由多模光纤的另一端射出检测,光纤探头与光纤

耦合器采用可拆卸的光纤连接器(如FC)进行连接,采用HF腐蚀法,得到约0.5 cm的锥形探针,锥角度为0.37。进行分析时,将硅烷化好的探头放入以大鼠IgG和Cy5.5的兔抗大鼠IgG为模式抗体抗原来考察系统的免疫检测性,一次检测的时间为10 min,检出最低浓度为10 μg/L。该传感器最大的优点是单多模光纤耦合器和探头之间采用可拆卸的连接结构,如果检测病毒性物质,只需更换成相应的抗体抗原生物识别分子的探头即可实现多种病毒样品的顺序检测^[14-15]。

5 结语

传感器在现代科学领域占有举足轻重的地位,由于它借鉴了很多新的科研成果,可能在现代动物医学和疾病的快速检测与诊断中大放异彩。生物传感器从信号的采集、分析到信号及数据的处理,甚至各种故障、误差的分析都运用了计算机技术,使得传感器检测更加准确客观,检测时间大大缩短,特异性和敏感性明显提高。同时,几种传感器技术相互融合成一种或少数几种检测技术,如学者Hong等设计的一种基于MEMS的纳米粒子荧光素的传感器在心血管疾病的诊断中表现出高度敏感、快速、可靠和自动的特点^[16];Cadarsu等报道空心波导^[17]可用于疾病的检测。同时,在传感器的使用中也发现了一些缺点,如溶液pH值和识别元件对检测影响较大,不同的纳米颗粒对检测有很大的影响,同时检测时间和周期能否缩短、使用寿命长短及稳定性、批量生产工艺等都需等待技术的完善。

参考文献

- [1] CLARK L C, LYONS C. Electrode system for continuous monitoring in cardiovascular surgery[J]. Ann NY Acad Sci, 1962, 102: 29-45.
- [2] 吴永强. 纳米金增敏的压电乙肝IgM免疫传感器研究[J]. 压电与声光, 2007, 29(01): 33-35.
- [3] 覃柳, 刘仲明, 邹小勇. 基于巯基和纳米金固定抗体的免疫传感器的初步应用研究[J]. 免疫学杂志, 2008, 24(1): 97-99.
- [4] 缪璐, 刘仲明, 张水华. 乙肝表面抗原压电免疫传感器阵列的研制[J]. 北京生物医学工程, 2007, 26(2): 161-162.
- [5] 安海珍, 袁若, 柴雅琴, 等. 基于聚硫董DNA纳米银复合物共修饰癌胚抗原免疫传感器的研究[J]. 化学学报, 2008, 66(6): 633-638.
- [6] 段秋林, 梅炳勋, 高岭, 等. PSA、复合PSA及相关指标在前列腺癌诊断中的应用[J]. 检验医学, 2008, 23(1): 79-81.
- [7] HIN Y Y, WANG J, LIU G, et al. A nanoparticle label/immunochemical biosensor for rapid and sensitive detection of prostate-specific antigen[J]. Biosens Bioelectron, 2008, 23(11): 1659-1665.
- [8] SHONS A, DORMAN F, NAJARIAN J. Immunoassay with coated piezoelectric crystals[J]. J Bond Mater Res, 1972, 6: 565-570.
- [9] 刘毅新, 王弘, 刘仲明, 等. 用于禽流感H5、H9亚型同步检测的压电免疫传感器阵列的研制[J]. 中国医学物理学杂志, 2007, 24(6): 425-434.
- [10] 宋敏, 王森, 张丽, 等. 2株O型口蹄疫病毒结构蛋白基因VP1的核苷酸序列分析[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2007(1): 31-33.
- [11] GAJENDRAGAD MR, KAMATH KN, ANL P Y, et al. Development and standardization of a piezoelectric immunobiosensor for foot and mouth disease virus typing[J]. Vet Microbiol, 2001, 78(4): 319-330.
- [12] 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的实研[J]. 中华医院感染学杂志, 2008, 18(3): 324-327.
- [13] MINORU Y, SHINT, KOHYAS, et al. Properties of the over-tone mode of the quartz crystal microbalance in a low viscosity liquid[J]. Anal Chim Acta, 2004, 5(10): 15-19.
- [14] 龙峰, 施汉昌. 倏逝波全光纤免疫传感器的开发及性能研究[J]. 分析化学, 2007, 36(6): 919-992.
- [15] 宋保栋, 施汉昌, 何苗, 等. 平面波导型荧光免疫传感器的制备与应用[J]. 分析化学, 2007, 35(3): 461-465.
- [16] HONG B, KAI J, REN Y, et al. Highly sensitive rapid, reliable, and automatic cardiovascular disease diagnosis with nanoparticle fluorescence in enhancer and sensors[J]. Adv Exp Med Biol, 2008, 614: 265-273.
- [17] CADARSO V J, FERNANDEZ-SANCHEZ C, LLOBERA A, et al. Optical biosensor based on hollow integrated waveguides[J]. Anal Chem, 2008, 80(9): 3498-3501.