

• 综 述 •

表面等离子共振生物传感器的研究进展及发展趋势*

刘 星, 黄 庆 综述, 府伟灵[△] 审校

(第三军医大学西南医院检验科, 重庆 400038)

关键词: 生物传感技术; 表面等离子共振; 快速检测

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2011. 03. 026

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)03-0341-03

20 世纪初, Wood 等^[1] 根据衍射光栅的反常衍射现象, 意识到表面等离子波 (surface plasmon wave, SPW) 的存在。1957 年, 研究者发现当电子穿过金属薄片时存在能量吸收峰, 他将这种消失峰称之为“能量降低的”等离子体模式, 并指出了这种模式与薄膜边界的关系, 第 1 次提出了用于描述金属内部电子密度纵向波动的“金属等离子体”的概念。20 世纪 60 年代, Kretschmann 和 Raether^[2] 与 Otto^[3] 研究了金属和介质界面用光学方法激励表面等离子共振 (surface plasmon resonance, SPR) 的问题。1982 年, Nylander 等^[4] 和 Liedberg 等^[5] 将 SPR 原理应用于气体检测和生物传感领域中。随着科技的进步, 传感器的应用范围也越来越广, 目前在医学诊断、环境监测、生物技术、药品研制和食品安全检验等领域具有广阔的应用前景。

1 SPR 生物传感器的分类

如果按照测量方式, 可分为: (1) 角度指示型, 即固定入射光波长, 观测反射光归一化强度达到最小时的入射角^[6-7]; (2) 波长指示型, 即固定入射光的入射角, 观测反射光归一化强度达到最小时的入波长^[8]; (3) 光强指示型, 即固定入射光的入射角和波长, 测量反射光的归一化光强^[9-10]; (4) 相位指示型, 即固定入射光的角度与波长, 测量入射光和反射光的相位差^[11]。这 4 种 SPR 生物传感器中, 前 2 种的应用最普遍, 第 3 种受扰动产生的误差较大, 不太实用。最后 1 种的灵敏度最高, 但系统需要一系列的高频电路。此外, 根据支撑表面等离子体的金属膜不同, 侧有金膜型和银膜型。对光纤 SPR 传感器, 还有单膜光纤和多膜光纤之分。

2 基本原理

SPR 是一种物理光学现象。表面等离子体 (surface plasmon, SP) 是沿着金属和电介质间界面传播的电磁波形成的^[12]。当平行表面的偏振光以称之为表面等离子体共振角入射在界面上, 发生衰减全反射时, 入射光被耦合入表面等离子体内, 光能大量被吸收, 在这个角度上由于 SPR 引起界面反射光显著减少^[13]。由于 SPR 对金属表面电介质的折射率非常敏感, 不同电介质其表面等离子体共振角不同。同种电介质, 其附在金属表面的量不同, 则 SPR 的响应强度不同^[14]。基于这种原理的生物传感器通常将一种具特异识别属性的分子即配体固定于金属膜表面, 监控溶液中的被分析物与该配体的结合过程。在复合物形成或解离过程中, 金属膜表面溶液的折射率发生变化, 随即被 SPR 生物传感器检测出来^[15]。

与传统的 ELISA 检测法相比, SPR 生物传感器具有如下显著特点: (1) 实时检测, 能动态地监测生物分子相互作用的全过程; (2) 无需标记样品, 保持了分子活性; (3) 样品需要量极少; (4) 检测过程方便快捷, 灵敏度高; (5) 应用范围非常广泛; (6) 高通量、高质量的分析数据; (7) 大多数情况下, 不需对样品进行预处理; (8) 能检测混浊的甚至不透明的样品。

3 SPR 生物传感器的应用进展

3.1 生物分子的结合作用 监控小分子 ($< 0.5 \times 10^3$) 的相互作用是 SPR 生物传感器的最重要的新兴作用之一。Boozer 等^[16] 用自主研制和改进的棱镜耦合式 SPR 传感器检测牛血清中的清蛋白溶液的单克隆抗体, 检测到的最低浓度为 $1 \mu\text{g/L}$ 。Biacore 系列仪器一直用高亲和力 ($< 1 \text{ nmol/L}$) 或低亲和力 ($> 1 \text{ mmol/L}$) 的小分子与其配体的相互作用研究^[17]。2003 年, Shen 等^[22] 利用 Biacore 2000 SPR 研究了戊聚糖磷酸盐或硫酸粘多糖与胰肽酶或透明质酸酶的相互作用。SPR 生物传感技术的研究还涉及到了蛋白质之间或蛋白质与 DNA 相互作用的检测、蛋白质结构变化的检测^[18-19], 抗瘤蛋白质 APC 的生物化学属性检测^[20], 以及糖蛋白与单克隆抗体的动态反应过程的检测等^[21]。Wendler 等^[25] 的光纤 SPR 传感器实验在静态条件下, 可检测出溶液中免疫球蛋白抗体中的最小质量浓度为 $90 \mu\text{g/L}$, 传感器灵敏度为 $3 \ 100 \text{ nm/RIU}$, 分辨率为 $3 \times 10^{-5} \text{ RIU}$ 。核苷酸还原酶类的小分子与其亚单位之间的反应也可以用 SPR 生物传感器进行分析。Crona 等^[23] 通过 30.5 \AA linker 让生物素化的核苷酸还原酶类与 SPR 抗生蛋白链菌素生物芯片相结合, 通过进一步比较研究来分析核苷酸还原酶类的小分子与其亚单位之间的反应情况。Beattie 等^[30] 用 SPR 传感器技术来检测胰岛素样生长因子的相互反应。

3.2 临床诊断 利用 SPR 生物传感器可鉴定和评价潜在的疫苗组分, 监测和定量测定患者血清中的生物药剂和抗体滴度, 跟踪检测动物模型、人类临床试验和多种台式应用中的生物反应物。2005 年, Brazier 等^[24] 利用 SPR 技术成功监测了低聚物探针的固定以及 DNA 杂交反应。Wendler 等^[25] 利用 SPR 生物传感器诊断出 HBV。

3.3 食物检测 目前, 可用于蜂产品、肉制品、奶制品中微生物、抗生素及食源性药物残留检测的多种 SPR 生物传感器已被研制出来。Waswa 等^[26] 用 SPR 传感器直接检测了食品中的大肠埃希菌 O157:H7 型。

3.4 创新性应用 SPR 生物传感器用于遗传分析是 1 个崭新

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30927007)。△ 通讯作者, E-mail: weilingfu@yahoo.com。

的领域,如用于 X 连锁型视网膜色素变性的分子遗传学研究、检测点突变,用于检测区分野生的和经遗传修饰的大豆基因序列等。SPR 生物传感器可以定量分析治疗性抗体浓度,也可以定量分析包括层析介质渗出的细菌、蛋白 A,蛋白 C,小分子配体等杂质^[27]。Gutiérrez-Gallego 等^[28]利用 SPR 生物传感器能够在动态的、免标记的状态下监控到生物分子的相互反应,并创建了新的 SPR 生物传感器免疫阵列检测方法。Xiang 等^[29]发现可以用纳米球结石造影技术焊接局限型 SPR 的金纳米孔洞来提高其对屈光指数的敏感性。Springer 等^[31]利用 SPR 传感器技术研究固相 DNA 杂交时,发现恰当的使用阳离子成分的缓冲液能够提高补体与点错配的 DNA 靶分子的辨别力。此外,SPR 成像技术是一种新兴的免标记与实时检测技术,它能同时监控上百种生物分子之间的相互反应,并且能够评估固定探针与配体溶液之间反应的动力学参数^[30-32]。

4 SPR 生物传感器的发展趋势

SPR 传感技术因其独特的技术优势,在最近 20 多年里得到了快速发展。SPR 生物传感器,如同适配子技术^[34],必将成为生物医学检测领域中最重要技术之一。现在,SPR 生物传感器已经在微流控芯片领域得到了很好的应用,并且有向小型化趋势发展。因此,研制具有自主知识产权的 SPR 传感系统已成当务之急。

参考文献

[1] Wood RW. On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum[J]. *Phil Magm*, 1902, 18(4): 396-402.

[2] Kretschmann E, Raether H. Radiative decay of non-radiative surface plasmons excited by light[J]. *Z Naturforsch A*, 1968, 23: 2135-2136.

[3] Otto A. Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection[J]. *A Physik*, 1968, 216(4): 398-410.

[4] Nylander C, Liedberg B, Lind T. Gas detection by means of surface plasmons resonance[J]. *Sensors and Actuators*, 1982, 3: 79-88.

[5] Liedberg B, Nylander C, Lundström I. Surface plasmons resonance for gas detection and biosensing[J]. *Sensors and Actuators*, 1983, 4: 299-304.

[6] Matsubara K, Kawata S, Minami S. Optical chemical sensor based on surface plasmon measurement [J]. *Appl Opt*, 1988, 27(6): 1160-1163.

[7] Liedberg B, Lunström I, Stenberg E. Principles of biosensing with an extended coupling matrix and surface plasmon resonance[J]. *Sensors and Actuators B*, 1993, 11(1-3): 63-72.

[8] Zhang LM, Uttamchandani D. Optical chemical sensing employing surface plasmon resonance[J]. *Electron Lett*, 1988, 24(23): 1469-1470.

[9] Nylander C, Liedberg B, Lind T. Gas detection by means of surface plasmons resonance[J]. *Sensors and Actuators*, 1982, 3: 79-88.

[10] Liedberg B, Nylander C, Lunström I. Surface plasmons resonance for gas detection and biosensing[J]. *Sensors and Actuators*, 1983, 4: 299-304.

[11] Notcovich AG, Zhuk V, Lipson SG. Surface plasmon resonance phase imaging[J]. *Appl Phys Lett*, 2000, 76(13): 1665-1667.

[12] Yeh WH, Kleingartner J, Hillier AC. Wavelength tunable surface plasmon resonance-enhanced optical transmission through a chirped diffraction grating[J]. *Anal Chem*, 2010, 82(12): 4988-4993.

[13] Sepulveda B, Alaverdyan Y, Alegret J, et al. Shape effects in the localized surface plasmon resonance of single nanoholes in thin metal films[J]. *Opt Express*, 2008, 16(8): 5609-5616.

[14] Wu L, Chu HS. Highly sensitive graphene biosensors based on surface plasmon resonance[J]. *Opt Express*, 2010, 18(14): 14395-14400.

[15] Kasai K. Biosensor based on surface plasmon resonance[J]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, 1992, 37(15): 2977-2984.

[16] Boozer C, Yu QM, Cheng SF, et al. Surface functionalization for self-referencing surface plasmon resonance biosensors by multi-step self-assembly[J]. *Sensors and actuators B*, 2003, 90(1-3): 22-30.

[17] Day YS, Baird CL, Rich RL, et al. Direct comparison of binding equilibrium, thermodynamic, and rate constants determined by surface- and solution-based biophysical methods [J]. *Protein Sci*, 2002, 11(5): 1017-1025.

[18] Mernagh DR, Janscak P, Firman K, et al. Protein-protein and protein-DNA interactions in the type I restriction endonuclease R. EcoR124[J]. *Biol Chem*, 1998, 379(4/5): 497-503.

[19] Hirroyuki S, Yukio H, Masahiro I. Detection of conformational changes in an immobilized protein using surface plasmon resonance[J]. *Anal Chem*, 1998, 70(10): 2019-2024.

[20] Deka J, Kuhlmann J, Müller O. A domain within the tumor suppressor protein APC shows very similar biochemical properties as the microtubule-associated protein tau[J]. *Eur J Biochem*, 1998, 253(3): 591-597.

[21] Crowe JE, Firestone CY, Crim R, et al. Monoclonal antibody-resistant mutants selected with a respiratory syncytial virus-neutralizing human antibody fab fragment (Fab 19) define a unique epitope on the fusion(F) glycoprotein[J]. *Virology*, 1998, 252(2): 373-375.

[22] Shen B, Shimmom S, Smith MM, et al. Biosensor analysis of the molecular interactions of pentosan polysulfate and of sulfated glycosaminoglycans with immobilized elastase, hyaluronidase and lysozyme using surface plasmon resonance (SPR) technology[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2003, 31(1): 83-93.

[23] Crona M, Furrer E, Torrents E, et al. Subunit and small-molecule interaction of ribonucleotide reductases via surface plasmon resonance biosensor analyses[J]. *Protein Eng Des Sel*, 2010, 23(8): 633-641.

[24] Brazier JA, Shibata T, Townsley J, et al. Amino-functionalized DNA: the properties of C5-amino-alkyl substituted 2'-deoxyuridines and their application in DNA triplex formation[J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(4): 1362-1371.

[25] Wendler J, Vallejo LF, Rinas U, et al. Application of an SPR-based receptor assay for the determination of biologically active recombinant bone morphogenetic protein-2 [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2005, 381(5): 1056-1064.

- [26] Waswa J, Irudayaraj J, DebRoy C. Direct detection of E. Coli O157 : H7 in selected food systems by a surface plasmon resonance biosensor[J]. LWT, 2007, 40(2): 187-192.
- [27] Thillaiyinayagalingam P, Gommeaux J, McLoughlin M, et al. Biopharmaceutical production: Applications of surface plasmon resonance biosensors[J]. J Chromatogr B, 2010, 878(2): 149-153.
- [28] Gutiérrez-Gallego R, Bosch J, Such-Sanmartín G, et al. Surface plasmon resonance immuno assays-A perspective [J]. Growth Horm IGF Res, 2009, 19(4): 388-398.
- [29] Xiang GS, Zhang N, Zhou XD. Localized surface plasmon resonance biosensing with large area of gold nanoholes fabricated by nanosphere lithography[J]. Nanoscale Res Lett, 2010, 5(5): 818-822.
- [30] Beattie J, Phillips K, Shand JH, et al. Molecular interactions in the insulin-like growth factor(IGF) axis: a surface plasmon resonance (SPR) based biosensor study[J]. Mol Cell Biochem, 2008, 307(1/2): 221-236.
- [31] Springer T, Sipova H, Vaisocherova H, et al. Shielding effect of monovalent and divalent cations on solid-phase DNA hybridization: surface plasmon resonance biosensor study[J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38(20): 7343-7351.
- [32] Scarano S, Mascini M, Turner APF, et al. Surface plasmon resonance imaging for affinity-based biosensors[J]. Biosens Bioelectron, 2010, 25(5): 957-966.
- [33] 陈翠敏, 张晓莉, 府伟灵. X 连锁型视网膜色素变性的分子遗传学研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(3): 227-229.
- [34] 姚春艳, 府伟灵. 适配子技术在生物传感器中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(8): 707-708, 712.

(收稿日期: 2010-08-23)

• 综 述 •

环介导等温扩增在病原诊断中应用*

李 鹏¹, 马艳娇^{1,2}, 夏 伟¹综述, 张西臣³审校

(1. 黑龙江八一农垦大学动物科技学院, 黑龙江大庆 163319; 2. 讷河市畜牧水产技术推广中心, 黑龙江讷河 161300; 3. 吉林大学畜牧兽医学院, 长春 130000)

关键词: 核酸扩增技术; 诊断; 环介导等温扩增

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2011. 03. 027

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)03-0343-03

经典的病原检测和诊断方法是体外培养和显微镜技术, 这种方法在临床实验室仍然是一项核心技术。但由于临床上很多病原体难以被选择培养, 从而限制了它们的诊断。尤其在发展中国家, 这种敏感性较低的抹片显微镜检查往往会延误治疗, 甚至导致死亡, 因此, 建立一种迅速、敏感、准确的诊断方法就更为重要。近年来, 在诊断技术上已经取得了一定的成果, 已开发出聚合酶链反应、连接酶链反应、核酸序列扩增和链置换扩增等多种体外扩增病原体核酸序列的方法, 这些方法都有了商品化的试剂盒, 它们的标准化和自动化的能力比传统方法更高, 还可以检测抗药。环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是一种新兴的快速扩增技术, 它利用 4 个特殊设计的引物和具有链置换活性的 DNA 聚合酶, 在恒温条件下特异、高效、快速地扩增 DNA, 非常适合于现场检测。

1 LAMP 技术的发展历史

1.1 LAMP 技术的原理 LAMP 可以在等温条件下快速、高效、特异地扩增 DNA 序列。LAMP 可以被分为 3 个阶段, 分别是: 开始阶段、扩增循环阶段、延伸阶段。LAMP 引物的设计是方法成败的关键, 引物设计主要是针对靶基因的 6 个不同的区域, 基于靶基因 3'端的 F3c、F2c 和 F1c 区以及 5'端的 B1、B2 和 B3 区等 6 个不同的位点设计 4 种引物^[1], 其中内引物 2 种, 分别是上游内部引物(forward inner primer, FIP)和下游内部引物(backward inner primer, BIP); 外部引物 2 种, 分别是上

游外部引物(forward outer primer)F3 和下游外部引物(backward outer primer)B3。60~65 °C 是双链 DNA 复性及延伸的中间温度, DNA 在 65 °C 左右处于动态平衡状态。因此, DNA 在此温度下合成是可能的。4 种特异引物依靠 1 种高活性链置换 DNA 聚合酶, 使得链置换 DNA 合成不停地自我循环, 从而实现快速扩增。

1.2 LAMP 技术的应用 LAMP 技术已被应用到沙门氏菌、军团杆菌、李斯特杆菌、大肠杆菌、弯曲杆菌等多种食源及病原微生物的检测中, 并已有相应的试剂盒问世。沙门氏菌是主要经食物传播的病原体, 可导致人类胃肠道疾病。有研究者已经表明 LAMP 技术可以用于检测沙门氏菌, 他们还把 LAMP 技术和普通 PCR 技术进行对比, 发现 LAMP 的敏感性高于普通 PCR。

大肠杆菌是另一种能够引起食源性疾病的病原体。Hara-Kudo 已经研制出一种鉴定大肠杆菌的 LAMP 试剂盒。研究者已经开发出可以快速灵敏诊断产肠毒素大肠杆菌的 LAMP 试剂盒。也有研究者研制了适用于检测人尿样本中常见大肠杆菌的 LAMP 试剂盒。

诺如病毒(Noroviruses, NoVs)是一组世界范围内引起流行性胃肠炎的重要病原, 主要通过污染水和食物传播, 牡蛎等贝壳类是常见的被污染食品, NoVs 也会通过密切接触或空气途径传播, 在学校和医院, NoVs 可以引起人与人之间的传染。由于 NoVs 无法培养, 只能通过电子显微镜来检测, 但是这种

* 基金项目: 大庆市科学技术局项目(SGG2007-048)。