

• 综 述 •

表面等离子共振技术在抗原抗体相互作用中的研究*

王佳颖^{1,2}综述, 宁 勇^{1△}审校, 刘 湘¹

(1. 湖北中医药大学检验学院, 湖北武汉 430065, 2. 湖北医药学院附属太和医院, 湖北十堰 442000)

关键词: 表面等离子体共振; 生物分子; 抗原; 抗体

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.05.041

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)05-0671-03

表面等离子共振 (SPR) 技术是利用生物大分子间的特异性结合进行分子识别, 并通过光激励-分子识别-光输出-电输出的途径, 完成分子间相互作用的信息传递与检测^[1]。1902 年, Wood^[2]发现光波通过光栅后, 光频谱发生小区域损失 (“Wood 异常”); 1971 年 Kretschmann^[3]提出 Kretschmann 结构, 为 SPR 传感器奠定基础; 1983 年 Liedberg 等^[4]将 SPR 技术用于抗原抗体的相互作用研究; 1990 年, Biacore 公司成功研发出人类一台 SPR 生化分析仪器, 使 SPR 传感技术的研究获得了迅速的发展。

SPR 技术具有诸多优点: (1) 免标记, 消除了标记物对待测物结构的影响和对检测反应造成干扰的可能性。(2) 实时、连续检测。(3) 样本要求低, 对混浊, 不透明或者有色的溶液也可实现检测。(4) 已广泛成功应用于免疫学、蛋白质组学、药物筛选、细胞信号转导等领域。

1 表面等离子体共振原理

当入射光以临界角入射到两种不同折射率的介质界面, SPR 反应原理如图 1 所示 (见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)时, 可引起金属自由电子的共振, 由于共振致使电子吸收了光能量, 从而使反射光在一定角度内大大减弱。其中, 使反射光在一定角度内完全消失的入射角称为 SPR 角。SPR 随表面折射率的变化而变化, 而折射率的变化又和结合在金属表面的生物相对分子质量成正比^[5]。因此, 可以通过获取生物反应过程中 SPR 角的动态变化, 得到生物分子之间相互作用的特异性信号。

抗原抗体相互作用的时候, 将抗原或抗体偶连在传感芯片上, 将含有分析物的样品利用蠕动泵以恒定的流速通过传感芯片表面, 若发生抗原抗体的结合反应, 会导致传感芯片表面分子浓度的变化。将 SPR 信号的改变以时间对信号响应 (mDeg) 连续作图, 记录反应过程。结合过程包括以下几个不同阶段: (1) 注入缓冲液, 稳定基线, 活化传感芯片表面的羧基; (2) 注射抗原或抗体偶连在传感芯片上, 用封闭剂封闭未活化的羧基, 再注射将含有分析物用样品发生抗原抗体结合反应; (3) 注入缓冲液, 进行解离反应; (4) 用再生剂对传感芯片再生, 使传感芯片可以进行反复多次实验。见图 2 (见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)

2 抗原抗体反应相互作用中的研究

现代检验医学的发展离不开日新月异的新技术, 表面等离子共振技术在研究抗原抗体相互作用时与传统的 ELISA 方法比较具有无标记, 实时, 连续等优点。可以, 用来检测和监测多种抗原抗体相互作用。陈泽忠等^[6]利用表面等离子共振技术对乙肝表面抗原进行测定, 实验结果表明 SPR 生物传感器 HBsAg 的检出限为 0.06 ng/mL, 而 ELISA 法对 HBsAg 的检

出限通常为 1 ng/mL, 这说明 SPR 生物传感器有较高检测灵敏度。在相同条件下, 用该 SPR 生物传感器对 HBsAg 质控血清与纯化的 HBsAg 溶液进行比较检测, 结果表明该 SPR 生物传感器对 HBsAg 具有好的特异选择性。Altintas 等^[7]利用双抗体夹心法这种传统免疫测定方法基于 SPR 生物传感器对肿瘤标志物 CEA 进行检测, 发现 CEA 的动态检测范围是 3~400 ng/mL, 而 CEA 最低检出浓度 3 ng/mL。Dutra 等^[8]利用表面等离子共振技术用来检测心肌肌钙蛋白 T (cTnT), 发现 cTnT 的线性范围为 0.05~4.5 ng/mL。这些都说明了表面等离子共振技术在临床医学检验领域有广阔的应用前景。而传统的直接利用 SPR 生物传感器检测抗原抗体相互作用, 当抗原或是抗体浓度过低时, 无法测量到很小的折射率的变化, 阻碍了其在精密检测中应用。为了, 进一步提高表面等离子共振技术灵敏度, 增强稳定度, 让其能广泛用于临床实际工作, 采用以下多种新方法。

2.1 表面修饰技术 随着表面等离子共振技术研究不断深入, 芯片表面修饰传统的羧甲基葡聚糖凝胶矩阵已不能满足表面等离子共振技术的检测水平要求。为了提高抗原抗体的结合能力, 对芯片表面修饰至关重要。Enrico 等^[9]在芯片表面修饰巯基十一酸后, 再包被蛋白 A, 嗜肺军团菌的抗体用来检测嗜肺军团菌, 在检测 $10^3 \sim 10^6$ CFU/mL 嗜肺军团菌时, 发现检出最低浓度是 10^3 CFU/mL, 在提高检验的灵敏度的同时, 与酶联免疫吸附测定与聚合酶链式比反应缩短了检测时间。石墨烯^[10]是一种从石墨材料中剥离出的单层碳原子面材料, 是碳的二维结构, 这种石墨晶体薄膜的厚度仅 0.335 nm, 是目前世上最薄却也是最坚硬的纳米材料。近年来, 石墨烯及其衍生物氧化石墨烯 (GO) 在生物医学领域得到了极大的应用。氧化石墨烯表面富含羧基、环氧基、羟基等功能团, 且其体表面积大和卓越的生物相容性^[11]。氧化石墨烯的芯片表面修饰开拓提高表面等离子共振技术灵敏度的一个新的领域。Chiu 等^[12]利用 8-巯基辛酸 (Au-MOA) 的包被芯片与半胱胺盐酸盐 (Au-Cys)-GO 修饰的芯片用来比较与牛血清白蛋白 (BSA) 的结合能力, 发现 2 mg/mL 的 GO 包被芯片可以结合 100 pg/mL 的 BSA, 而传统的 Au-MOA (8-巯基辛酸) 的包被芯片只能结合 10 ng/mL 的 BSA。说明用 GO 包被后的芯片具有高灵敏度和低检出限的优势。Zhang 等^[13]在金膜表面修饰硫化乙醇胺后包被氧化石墨烯, 利用金纳米棒和抗体连接检测转铁蛋白, 发现转铁蛋白的浓度在 0.037 5~40 μ g/mL 有很好的响应, 浓度为 0.037 5 μ g/mL 的转铁蛋白也可以被检测出来, 与使用金膜包被检测转铁蛋白的传统方法相比, 其检测灵敏度提高了 32 倍。这种方法还具有普适性, 通过改变表面修饰抗体可实现对其他蛋白质的检测, 可以更加广泛适用于临床实验室的检验

* 基金项目: 湖北省自然科学基金项目 (2014CFB220)。 作者简介: 王佳颖, 女, 检验技师, 主要从事临床检验研究。 △ 通讯作者, E-mail: ningyong128@163.com。

工作。

2.2 减少非特异性吸附技术 研究抗原-抗体相互作用时,非特异性吸附是实验过程中一大难点问题。非特异性吸附在多数情况下难以完全消除,其带来的信号叠加在分子间特异性结合的信号上,严重影响正常的分析。以下几种方法在减少非特异性吸附中发挥着重要的作用:(1)在缓冲液中加入 PBS-T^[14](0.05% Tween20, pH 7.4)是防止非特性吸附的有效方法之一;(2)随着科学技术的日新月异,用惰性封闭试剂或具疏基化合物来组成非吸附性表面也是抑制非特异性吸附的经常一种新方法。Uludag 等^[15]利用 BSA 对芯片表面进行封闭,利用 EA(乙醇胺)对未活化的 NHS 脂(羟基琥珀酰亚胺)进行封闭,减少非特性吸附。Uchida 等^[16]利用聚乙二醇(PEG)这种疏基化合物构建非特异性吸附表面也可起到突出作用;(3)近年来,可移除膜封闭技术是一种降低非特异性吸附的有效方法。杨彦等^[17]利用双十二烷基二甲基溴化铵制备可移除型保护膜。该保护膜具有良好的稳定性和重现性,提高了对球蛋白的抑制效果。这些减少非特异吸附的技术,为实现更加灵敏的免疫分析提供一种新的方法。

2.3 信号放大技术 一些小分子的分析物因为浓度低而引起很小的折射率改变,很难用表面等离子共振技术传统的方法检测出来。为了提高表面等离子共振技术灵敏度,增大这些小分子分析物的反应信号,更好为临床检验工作服务。采用以下方法增大反应信号进行检测。Liang 等^[18]将 SPR 生物传感器与使用 ELASE 中经典的双抗体夹心法联用,把 Fe₃O₄@Au 磁性纳米粒子与第二抗体相连,来检测甲胎蛋白(AFP),发现 AFP 的检出限是 0.65 ng/mL,在 1~200 ng/mL 有很好的线性关系。Mani 等^[19]发现抗体连接超顺粒子与抗原结合的结合常数与单独抗原抗体结合常数相比增加一百倍。利用这种与抗体相结合的超顺粒子检测相应的抗原检出限可低至 FM/L 到 AM/L 水平。Wang 等^[20]利用金/银合金的纳米复合材料检测 IgG 蛋白,发现 IgG 蛋白 0.15~40 μg/mL 时会展现出一个很好的响应,用这种方法检测出 IgG 蛋白最低浓度是 0.15 μg/mL。这些方法应用不断提高表面等离子共振技术灵敏度,为 SPR 生物传感器检测小分子分析物提供了一个良好的契机。

生物素-亲和素系统(BAS)是 70 年代末发展起来的一种新型生物反应放大系统。BAS 已成为目前广泛用于微量抗原、抗体定性、定量检测及定位观察研究的新技术。Teramura 等^[21]将链霉亲和素和纳米珠相连与亲和素标记的第二抗体,芯片表面修饰的第一抗体使用双抗体夹心法检测脑利钠肽(BNP),这种方法可以发现更低浓度的 BNP,可以检测出 100 pg/mL 的 BNP,可以适用于临床标本的检测,为疾病的早期诊断提供了一种新的方法。Soelberg 等^[22]将 IMB(超顺磁的磁珠)-SPR 体系与生物素-亲和素系统联用检测 SEB(葡萄球菌肠毒素),发现低浓度的 SEB(100 pg/mL)在缓冲液和实际样本中都可以实验检测。这些方法说明了生物素-亲和素系统不仅可以应用于小分子分析物,而且可以和 IMB-SPR 体系联用,进一步放大反应信号,这为 SPR 技术应用于现代医学研究奠定了新的平台。

3 总结与展望

表面等离子共振(SPR)近年来迅速发展起来的一种用于分析生物分子相互作用的一项高新技术。它拥有免标记,实时连续检测,无损伤检测等优点,广泛应用于免疫学、蛋白质组学、药物筛选、细胞信号转导等多个领域。但是,SPR 免疫传感技术在降低检测成本,尤其是传感芯片的成本,提高生物样本检测性能及实现高通量复合型检测等方面仍具有很大的改

进空间^[23]。当前,SPR 技术研究的重点集中在:(1)改进基底材料表面处理技术和寻找合适的缓冲体系,提高结合反应率和减少非特异性吸附。(2)制备出多功能芯片,并能够保持芯片表面的物质的稳定性和生物活性。(3)开发出功能更加完善,灵敏度和分辨率更高的仪器和检测方法^[24]。

局域表面等离子体共振(LSPR)是存在于金属纳米粒子或不连续的金属纳米结构中的电荷密度振荡,当其被入射光激发,引起 LPS 共振(LSPR)时,该金属纳米结构表面的局域电场被增强,展现出强烈的吸收金属纳米粒子具有很强的 LSPR 效应,它们在紫外-可见光波段展现出很强的光谱吸收^[25]。这种技术为解决 SPR 技术设备成本高问题提供了可能,提高了生物样本检测性能及实现高通量复合型检测。同时,与传统 SPR 相比更便于携带。因此,今后,SPR 的发展必将着手于降低成本,提高生物样本的检测性,适用于小分子物质的检测,及实现高通量的复合型检测。在科研工作者共同努力下,SPR 生物传感器的技术水平将不断提高,其应用也将进入更加广阔的医学领域。

参考文献

- [1] 杨彦,戴宗,邹小勇.表面等离子体共振技术在蛋白质-蛋白质相互作用研究中的应用[J].分析测试学报,2009,28(11):1344-1350.
- [2] Wood RW. On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum[J]. Proc Phys Soc, 1902, 18(1): 269-275.
- [3] Kretschman E. The Determination of the optical constants of metals by the excitation of surface plasmon[J]. Zeitschrift fur Physik, 1971, 241(4): 313-324.
- [4] Liedberg B, Nylander C, Lundstrom I. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing[J]. Sens Actuator B, 1983, 4(2): 299-304.
- [5] Homola J. Present and future of surface plasmon resonance biosensors[J]. Anal Bioanal Chem, 2003, 377(3): 528-539.
- [6] 陈泽忠,王柯敏,羊小海,等.表面等离子体共振生物传感器用于乙肝表面抗原的测定[J].化学学报,2003,61(1):137-140.
- [7] Altintas Z, Uludag Y, Gurbuz Y, et al. Surface plasmon resonance based immunosensor for the detection of the cancer biomarker carcinoembryonic antigen[J]. Talanta, 2011, 86(1): 377-383.
- [8] Dutra RF, Kelly Mendes RK, Lins da Silva V, et al. Surface plasmon resonance immunosensor for human cardiac troponin T based on self-assembled monolayer[J]. J Pharm Biomed Anal, 2007, 43(5): 1744-1750.
- [9] Enrico DL, Manera MG, Montagna G, et al. SPR based immunosensor for detection of Legionella pneumophila in water samples[J]. Optics Commun, 2013, 294(63): 420-426.
- [10] Geim AK, Novoselov KS. The rise of graphene[J]. Nat Mater, 2007, 6(3): 183-191.
- [11] Zhang H, Song DQ, Gao S, et al. Enhanced wavelength modulation SPR biosensor based on gold nanorods for immunoglobulin detection[J]. Talanta, 2013, 115(54): 857-862.
- [12] Chiu NF, Huang TY. Sensitivity and kinetic analysis of graphene oxide-based surface plasmon resonance biosensors[J]. Sens Actuator B Chem, 2014, 197(65): 35-42.
- [13] Zhang J, Sun Y, Xun B, et al. A novel surface plasmon resonance biosensor based on graphene oxide decorated with gold nanorod-antibody conjugates for determination of transferrin[J]. Biosens Bioelectron, 2013, 45(61): 230-236.
- [14] Vega B, Calle A, Sanchez A, et al. Real-time detection of the chemokine CXCL12 in urine samples by surface plasmon resonance

- [J]. *Talanta*, 2013, 109(12): 209-215.
- [15] Uludag Y, Tothil I E. Cancer biomarker detection in serum samples using surface plasmon resonance and quartz crystal microbalance sensors with nanoparticle signal amplification [J]. *Anal Chem*, 2012, 84(14): 5898-5904.
- [16] Uchida K, Otsuka H, Kaneko M, et al. A reactive poly(ethylene glycol) layer to achieve specific surface plasmon resonance sensing with a high S/N ratio; the substantial role of a short underbrushed PEG layer in minimizing nonspecific adsorption [J]. *Anal Chem*, 2005, 77(4): 1075-1080.
- [17] 杨彦, 戴宗, 邹小勇. 可移除保护膜抑制蛋白质非特异性吸附的表面等离子体共振研究 [J]. *分析化学*, 2009, 37(13): 392.
- [18] Liang RP, Yao GH, Fan LX, et al. Magnetic Fe₃O₄ Au composite-enhanced surface plasmon resonance for ultrasensitive detection of magnetic nanoparticle-enriched α -fetoprotein [J]. *Anal Chim Acta*, 2012, 737(21): 22-28.
- [19] Mani V, Wasalathanthri DP, Joshi AA, et al. Highly efficient binding of paramagnetic beads bioconjugated with 100 000 or more antibodies to protein-coated surfaces [J]. *Anal Chem*, 2012, 84(23): 10485-10491.
- [20] Wang J, Song DQ, Wang LY, et al. Design and performances of immunoassay based on SPR biosensor with Au/Ag alloy nanocomposites [J]. *Sens Actuator B Chem*, 2011, 157(32): 547-553.
- [21] Teramura Y, Arima Y, Iwata H, et al. Surface plasmon resonance-based highly sensitive immunosensing for brain natriuretic peptide using nanobeads for signal amplification [J]. *Anal Biochem*, 2006, 357(2): 208-215.
- [22] Soelberg SD, Stevens RC, Limaye AP, et al. Surface plasmon resonance detection using antibody-linked magnetic nanoparticles for analyte capture, purification, concentration, and signal amplification [J]. *Anal Chem*, 2009, 81(6): 2357-2363.
- [23] 徐霞, 叶尊忠, 吴坚, 等. 表面等离子体共振免疫传感器在蛋白质检测中的应用及其研究进展 [J]. *分析化学评述与进展*, 2010, 38(7): 1052-1059.
- [24] 马国欣, 邱胜宝, 向鹏, 等. 表面等离子体共振技术在生化检测中的研究进展 [J]. *真空电子技术*, 2010, (3): 28-33.
- [25] 洪昕, 杜丹丹, 裘祖荣, 等. 半球壳结构金纳米膜的局域表面等离子体共振效应 [J]. *物理学报*, 2007, 56(12): 7219-7223.

(收稿日期: 2014-10-16)

• 综 述 •

和肽素的实验室检测及其在心力衰竭中的临床应用前景*

李晶晶 综述, 王伟佳, 孙各琴, 张秀明[△] 审校

(中山大学附属中山医院检验医学中心, 广东中山 528403)

关键词: 和肽素; 精氨酸加压素; 心力衰竭

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.05.042

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)05-0673-03

心力衰竭(HF)是各种病因所致心脏病发展到终末阶段的临床综合征,严重影响患者的生活质量及生存指数^[1]。HF的病理生理变化及临床表现具有多样性和复杂性, NHYA 分级将 HF 分为 I、II、III、IV 四级。因此,对 HF 做出及早诊断及分级,实现 HF 的个体化治疗非常重要。近年来,精氨酸加压素(AVP)在 HF 发病中的病理生理过程引起了广泛关注。AVP 在颈动脉压力感受器感受血容量过低时分泌增加,具有收缩周围血管的生理作用^[2]。和肽素(CT-proAVP)作为抗利尿激素原的分解产物羧基端肽段具有与抗利尿激素原(proAVP)同样稳定的性质,最近已报道有一种成熟的方法用来检测 CT-proAVP^[3]。AVP 受体拮抗剂^[4]在 HF 中具有很好的治疗前景,大量临床资料显示,AVP 受体拮抗剂有望成为治疗 HF 的新药物。CT-proAVP 对预测 HF 的预后及 AVP 受体拮抗剂的疗效至关重要,本文就 CT-proAVP 的实验室检测方法以及其对 HF 的预后和治疗前景进行综述。

1 和肽素的生理与生化功能

Copeptin 是精氨酸加压素原的羧基肽,位于羟基末端,在血浆中的浓度及变化趋势和 AVP 一致。Copeptin 和 AVP 都是从精氨酸加压素原肽链上剪切下来的多肽,它们的摩尔浓度一致。Copeptin 结构非常稳定,在体内几乎不降解,没有酶切位点和受体,通过肾脏排泄。1972 年 Holwerda 发现了 Copeptin^[5],证实 CT-proAVP 是由神经垂体分泌的循环型糖基化多

肽片段,相对分子质量为 5 000 u,含有 39 个氨基酸。目前 CT-proAVP 的生理功能尚不清楚,但因加压素原是由 CT-proAVP、神经垂体后叶素运载蛋白 II、AVP 和信号肽共同组成的含有 164 个氨基酸的前体物质^[6],所以有人推测 CT-proAVP 在抗利尿激素原的形成中起重要作用,且参与其结构的校正,Copeptin 缺乏可能引起加压素原折叠不良出现中枢性尿崩症。AVP 含 9 个氨基酸,由下丘脑神经元合成后,储存于神经垂体,在某些刺激条件下,如低氧、酸中毒、低血压、感染、高渗等刺激下释放入血。AVP 的主要生理作用是收缩血管、维持血流动力学稳定、抗利尿、调节血浆渗透压、参与应激反应、调控内分泌系统和中枢神经系统、调节心血管稳态,但半衰期特别短,在体外测定很受限,所以在临床上的应用也受到限制。而 CT-proAVP 因其所具有的生理特性且反映的病理生理信息与 AVP 相同,因此可以作为代替 AVP 的生物标志物用于临床研究。

2 和肽素的测定方法

AVP 释放入血后大部分附着于血小板且以相当快的速度被清除,直接导致检测结果偏低^[7-8]。而从血液标本中完全去除血小板会引起 AVP 假性升高或对 AVP 水平有不同程度的影响,这些分析前因素都会引起 AVP 测量结果的偏差。目前实验室对于检测血清 AVP 浓度方法的可靠性非常关注,由于 AVP 半衰期短^[9],体外极不稳定,相对分子质量小等特性使其

* 基金项目:中山市科技计划项目(20132A091)。 作者简介:李晶晶,女,在读研究生,主要从事临床生物化学检验与工作研究。 [△] 通讯作者, E-mail: zxm0760@163.com。