

· 论 著 ·

适配子快速检测炎性指标 C 反应蛋白的免疫传感器*

孟凡达, 吕衍民, 孙雪梅, 孙晓艳

(山东第一医科大学第一附属医院基础医学研究所, 山东济南 250062)

摘要:目的 建立利用易合成、价格低廉的适配子代替标记抗体进行炎性指标 C 反应蛋白(CRP)检测的方法。方法 探讨基于硅片表面的可视化免疫检测方法,对适配子检测 CRP 的离子强度、特殊离子的影响等条件进行了优化,采用图像处理软件对硅片表面磁颗粒分布图像进行定量化处理,反应区的磁颗粒数目与抗原的水平呈正相关,从而实现对血清中 CRP 水平进行定量检测。结果 该方法获得检测结果的时间不超过 15 min,操作简单,建立了适配子检测 CRP 的标准曲线,最低检出限为 0.5 ng/mL,检测范围为 10~5 000 ng/mL。结论 该方法极大降低了检测成本,可以满足临床检测的要求,具有良好的应用前景。

关键词:适配子; C 反应蛋白; 快速检测

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.06.002

中图法分类号:R446.61

文章编号:1673-4130(2020)06-0644-04

文献标识码:A

Biosensor for rapid detection of infection biomarker C-reactive protein by aptamer*

MENG Fanda, LYU Yanmin, SUN Xuemei, SUN Xiaoyan

(Institute of Basic Medicine, the First Affiliated Hospital of Shandong First Medical University, Jinan, Shandong 250062, China)

Abstract: Objective Establish a method using synthetic and cheap aptamer replace detection antibody for C-reactive protein (CRP) detection. **Methods** Based visual immunoassay on the surface of silicon chip, buffer systems of ionic strength, special effects of ion was optimized. Magnetic particle on silicon chip surface was quantitative using image processing software which is correlation with the antigen concentration. **Results** The whole analysis process could be completed within 15 min. There was a very good linear correlation between response and CRP concentration in the range of 10—5 000 ng/mL, and the detection limit was 0.5 ng/mL. The Intra-assay precision and Inter-assay precision were less than 15%. **Conclusion** This immunoassay is meet clinical requirements, has good prospects and well suitable for the clinical detection of CRP.

Key words: aptamer; C-reactive protein; rapid detection

适配子又称适体、适配体^[1-5],指的是通过体外筛选技术——指数富集的配体系统进化技术(SELEX),从含有大量序列的随机 DNA 或者 RNA 文库中筛选出的能与蛋白质或其他小分子物质等靶标特异结合的短链分子。适配子与靶分子的结合方式与抗原-抗体的结合相似,但是适配子相对于抗原-抗体的结合又具有亲和力强、特异性高、靶分子广、容易修饰、合成廉价、稳定性好的优点。适配子空间构象的形成是有效识别靶分子的关键,适配子构象的形成主要受离子强度、特殊离子(Ca²⁺、Mg²⁺)等方面影响^[6-8]。C 反应蛋白(CRP)是体内炎性标志物之一,在健康人血清中水平极低,在炎症急性期、恶性肿瘤、局部缺血、组织损伤等患者的血清中,CRP 水平急剧增加^[9-13]。目前,CRP 已被视为心血管疾病的独立危险因素,并且

成为心脏疾病诊断及预后的主要标志物之一。传统的 CRP 检测方法都是以抗原抗体的特异性反应为基础的,如酶联免疫吸附法、胶体金法、比浊法等。利用双抗体夹心法进行 CRP 检测时,标记抗体的制备往往十分烦琐,不仅增加了检测的成本,而且抗体的修饰会在一定程度上影响抗体的表位,降低对抗原的特异性识别。笔者建立了一种基于硅片表面的可视化免疫检测原理的适配子快速检测 CRP 免疫传感器^[14],本方法具有检测时间短、操作简便的优点,并且大大降低了 CRP 的检测成本,方法的灵敏度和准确性都可以满足临床的检测需要。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 光学显微镜为 Olympus 公司产品,GeSim Nano-Plotter 型超微量点样仪为德国 GeS-

* 基金项目:山东省医药卫生科技发展计划项目(2017WS075)。

作者简介:孟凡达,男,助理研究员,主要从事生物传感器及体外诊断 POCT 快速检测方法研究。

本文引用格式:孟凡达,吕衍民,孙雪梅,等.适配子快速检测炎性指标 C 反应蛋白的免疫传感器[J].国际检验医学杂志,2020,41(6):644-647.

im 公司产品。CRP 捕获抗体、CRP 抗原为杭州启泰生物科技有限公司产品；吐温-20 购自北京欣经科生物科技有限公司；链霉亲和素磁颗粒(500 nm)购自东莞博识科技有限公司；硅片(5.00 mm×8.00 mm×0.75 mm)购自北京大学微电子系；戊二醛购自国药集团化学试剂有限公司；3-氨基丙基三乙氧基硅烷(APTES)购自国药集团化学试剂有限公司；小牛血清购自北京欣经科生物科技有限公司；海藻糖购自日本林原公司；其他未提及试剂均为分析纯；实验用水均为超纯水。5'端生物素标记适配子，序列为 5'-生物素-GGC AGG AAG ACA AAC ATA TAA TTG AGA TCG TTT GAT GAC TTT GTA AGA GTG TGG AAT GGT CTG TGG TGC TGT-3'^[15]，由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 缓冲溶液、稀释液等溶液的配制 (1)磷酸盐缓冲液(PBS)的配制：称取磷酸二氢钾 0.24 g，磷酸氢二钠 1.44 g，氯化钠 7.90 g，氯化钾 0.22 g，用超纯水溶解，以 0.1 mol/L HCl 和 0.1 mol/L NaOH 调节 pH 至 7.4 后用水稀释至 1 000 mL。(2)Tris 缓冲溶液的配制：称取 Tris 6.05 g，氯化钠 7.90 g，氯化钾 0.22 g，用超纯水溶解，以 0.1 mol/L HCl 和 0.1 mol/L NaOH 调节至所需 pH 后用水稀释至 1 000 mL。(3)碳酸盐缓冲液的配制：称取无水碳酸钠 1.59 g，碳酸氢钠 2.93 g，用超纯水溶解，以 0.1 mol/L HCl 和 0.1 mol/L NaOH 调节 pH 至 9.60 后用水稀释至 1 000 mL。(4)CRP 标准溶液的配制：用小牛血清将

CRP 抗原标准品配制所需水平待用。(5)适配子溶液的配制：用相应稀释液将 5'端生物素标记适配子稀释至所需水平备用。(6)捕获抗体稀释液的配制：海藻糖 1 g，使用 pH 9.60 碳酸盐缓冲液溶解至 10 mL。**1.3 免疫反应基本原理** 适配子快速检测 CRP 免疫传感器基本操作过程见图 1，步骤如下。(1)硅片表面功能化处理：使用等离子清洗机处理硅片表面后，用 APTES 溶液浸泡硅片 10 min，氮气吹干，使用戊二醛溶液处理硅片表面，从而在硅片表面形成活性醛基，用于固定捕获抗体。(2)捕获抗体的固定：使用微量点样仪在硅片表面点上 50 μg/mL CRP 捕获抗体，37 °C 反应 30 min 后，使用 BSA 溶液封闭非点样区，芯片 4 °C 储存备用。(3)CRP 抗原的反应：将待测抗原溶液 15 μL 滴加到硅片表面，37 °C 反应 3 min，形成捕获抗体-抗原复合物，使用磷酸盐吐温缓冲液(PBST)清洗除去残留样本。(4)生物素标记适配子反应：将适配子溶液 15 μL 滴加到硅片表面，37 °C 反应 5 min，形成捕获抗体-抗原-适配子的夹心结构，PBST 清洗除去表面溶液。(5)亲和素磁颗粒反应：将亲和素磁颗粒溶液 15 μL 滴加到硅片表面，37 °C 反应 3 min，在硅片表面形成捕获抗体-抗原-适配子-磁颗粒的结构，使用 PBST 清洗除去残留样本。(6)结果处理：使用显微镜对反应区域拍照，并使用软件对表面磁颗粒进行计数，反应区的磁颗粒数量与抗原的水平呈正相关。

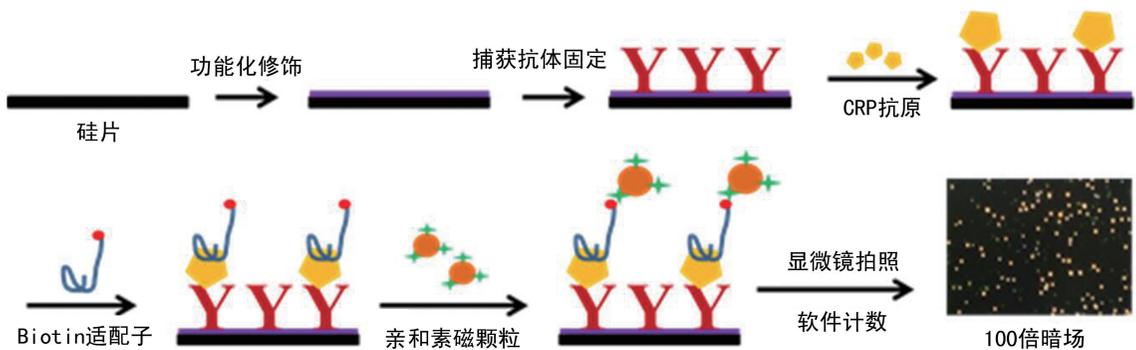


图 1 适配子检测 CRP 示意图

2 结 果

2.1 检测技术的建立与条件优化

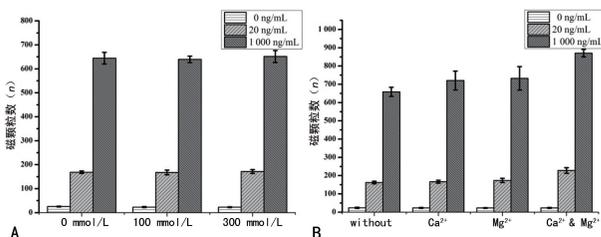
2.1.1 离子强度的优化 分别使用含 0、100、300 mmol/L NaCl 的 Tris 缓冲液作为生物素标记适配子的稀释溶液，分别检测 0、20、1 000 ng/mL 的 CRP。随着 NaCl 水平的改变，适配子作为标记检测 CRP 时的反应强度并没有发生明显的改变，见图 2A，说明在 0~300 mmol/L 的 NaCl 水平范围内，NaCl 水平的改变不会明显影响该适配子在笔者建立的基于硅片表面的静态免疫反应条件下对 CRP 的有效识别。

2.1.2 Ca²⁺ 和 Mg²⁺ 的影响 分别使用加入 CaCl₂

(10 mmol/L)、MgCl₂ (1 mmol/L) 及两者均添加的 Tris 缓冲液作为适配子的稀释溶液，分别检测 0、20、1 000 ng/mL 的 CRP。见图 2B，相对于不加入 Ca²⁺、Mg²⁺，在缓冲溶液中加入 Ca²⁺、Mg²⁺ 后，适配子检测 CRP 时的反应强度要略高于没有加入 Ca²⁺、Mg²⁺ 时的反应强度。这说明单独的 Ca²⁺、Mg²⁺ 确实都能够对适配子的空间构象产生一定的影响，从而提高了反应强度，但这种影响并不是特别明显。在同时加入 Ca²⁺、Mg²⁺ 后，检测的反应强度相对于单独加入 Ca²⁺、Mg²⁺ 也相对较高，说明 Ca²⁺、Mg²⁺ 同时存在时，适配子的空间构象更有利于在基于硅片表面的静

态免疫实验中对 CRP 抗原进行有效识别。

2.1.3 适配子水平的优化 在 CRP 水平为 0、20、1 000 ng/mL 的条件下,考察适配子水平对检测结果的影响。见图 3,当适配子水平达到 6 μg/mL 时,磁颗粒数目不再随适配子水平的增加而增加,说明反应已经达到饱和状态。后续实验中,确定适配子水平为 6 μg/mL。



注:A 为不同 NaCl 水平的缓冲体系;B 为不同特殊离子存在的缓冲体系。

图 2 不同缓冲体系适配子检测 CRP 的情况

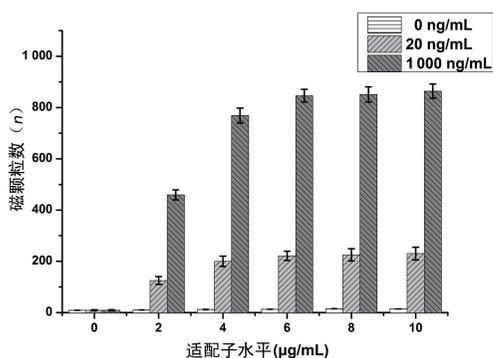


图 3 不同适配子水平检测 CRP 结果

2.1.4 捕获抗体稳定性 包被在芯片上的捕获抗体的稳定性会影响检测方法的精密性及准确性。考察了包被好捕获抗体的芯片在 37 °C 放置一定时间后对 CRP 检测的影响,CRP 的水平为 0、20、1 000 ng/mL。见图 4,在 37 °C 放置 7 d 后,捕获抗体仍能保持很高的反应活性。

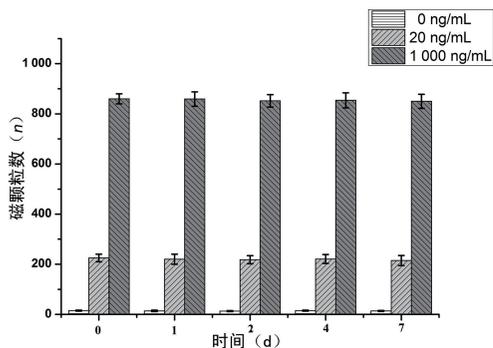


图 4 捕获抗体在 37 °C 放置一定时间后对检测稳定性的影响

2.2 性能评价

2.2.1 标准曲线 在已经设定好的反应条件下,建立 CRP 在 10~5 000 ng/mL 检测的标准工作曲线,见图 5。标准曲线的相关系数大于 0.99,说明线性关系良好,可以用于临床样本的定量检测。以空白溶液

测定值的 3 倍标准偏差确定方法的最低检出限,该方法的最低检出限为 0.5 ng/mL。

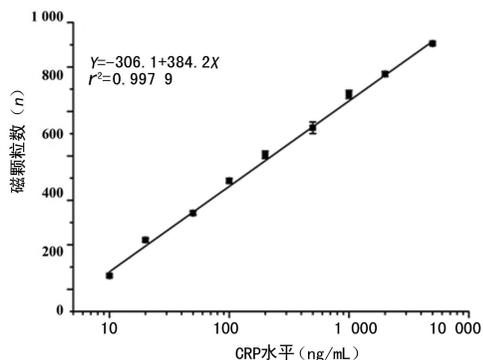


图 5 CRP 检测的标准曲线

2.2.2 特异性 当 CRP 为 20 ng/mL 时,在血清中添加 50 μg/mL 的 CEA 和 50 μg/mL 的 AFP,见图 6,其他抗原的加入并没有影响 CRP 的检测,说明适配子用于该检测方法的特异性良好。

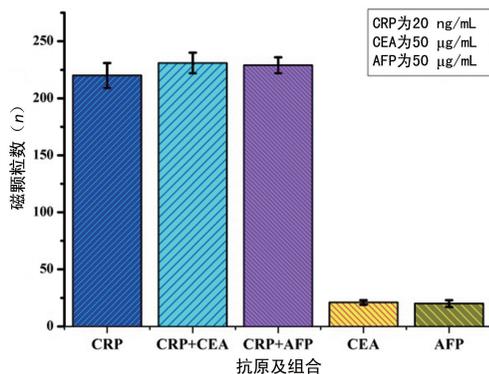


图 6 方法的特异性试验

2.2.3 回收率和精密性 考察了该检测方法在 CRP 水平为 10、50、1 000 ng/mL 时的批内及批间精密性[以相对标准偏差(RSD)表示]。如表 1 所示,平均回收率为 96.8%~101.2%,批内变异系数及批间变异系数均小于 15%,说明此方法检测 CRP 具有良好的精密性和重现性。

表 1 血清中 CRP 检测的回收率、批内和批间精密性 (n=4)

序号	CRP 水平 (ng/mL)	平均回收率 (%)	批内 RSD (%)	批间 RSD (%)
1	10	101.2	10.5	11.4
2	50	99.1	8.4	12.1
3	1 000	96.8	3.9	5.4

3 讨论

适配子快速检测炎症指标 CRP 免疫传感器将免疫测定技术与生物传感技术相结合,使用适配子取代标记抗体,通过可视化的方法进行结果呈现,能够综合多方面的优势,具有高灵敏度、高特异性,操作简便、快速的特点。利用适配子取代标记抗体,能够避免标记抗体修饰过程中对抗体特异性的影响,而且适

配子更易合成及储存,有助于降低免疫检测方法的成本,提高检测的稳定性。

为了使免疫传感器的性能达到最佳,本文对检测条件进行了优化,结果表明,适配子溶液离子强度对检测结果影响不明显;Ca²⁺、Mg²⁺同时存在时,免疫传感器检测结果最佳;当适配子水平达到 6 μg/mL 时,免疫反应达到饱和;加急反应显示修饰好捕获抗体的芯片在 37 °C 放置 7 d 仍能保持很高的反应性。在最优的反应条件下,该免疫传感器在 15 min 内即可获得检测结果,最低检出限为 0.5 ng/mL,检测范围为 10~5 000 ng/mL,灵敏度高,特异性强。本方法平均回收率为 96.8%~101.2%,批内变异系数及批间变异系数均小于 15%,呈现出良好的精密度和重现性。免疫传感器的下一步研究可以使用适配子取代捕获抗体,从而进一步降低检测成本;与微流体技术相结合,将检测方法集成为微流体芯片,使用一步法检测 CRP,从而更适用于临床的快速检测。

4 结 论

本研究使用适配子代替标记抗体,建立了基于硅片表面可视化免疫检测方法快速检测 CRP 的方法。本方法利用可大量廉价合成的适配子代替昂贵的抗体,大大降低了检测的成本,而且不会出现抗体在制作过程中批间活性不一致的现象。本方法中 CRP 的检测范围及检出限能够满足一定的临床需求,而且检测简便、快速。并且本方法在医学检测的其他领域也具有巨大的应用价值。

参考文献

[1] ELLINGTON A D, SZOSTAK J W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands [J]. Nature, 1990, 346(30): 818.

[2] WANG H, HUANG X, WEN G, et al. A dual-model SERS and RRS analytical platform for Pb(II) based on Ag-doped carbon dot catalytic amplification and aptamer regulation [J]. Sci Rep, 2019, 9: 9991.

[3] TUERK C, GOLD L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase [J]. Science, 1990, 249(4968): 505-510.

[4] TORRES-CHAVOLLA E, APCILJA E C. Aptasensors for detection of microbial and viral pathogens [J]. Biosens Bioelectron, 2009, 24(11): 3175-3182.

[5] HOON S, ZHOU B, JANDA K D, et al. Aptamer selection by high-throughput sequencing and informatic analysis [J]. Biotechniques, 2011, 51(6): 413-416.

[6] HUANG C J, LIN H I, SHIESH S C, et al. Integrated microfluidic system for rapid screening of CRP aptamers utilizing systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) [J]. Biosens Bioelectron, 2010, 25(7): 1761-1766.

[7] KANG K, SACHAN A, NILSEN-HAMILTON M, et al. Aptamer functionalized microcantilever sensors for cocaine detection [J]. Langmuir, 2011, 27(23): 14696-14702.

[8] KIM Y H, SUNG H J, KIM S, et al. An RNA aptamer that specifically binds pancreatic adenocarcinoma up-regulated factor inhibits migration and growth of pancreatic cancer cells [J]. Cancer Letters, 2011, 313(1): 76-83.

[9] ANSAR W, BANDYOPADHYAY S M, CHOWDHURY S, et al. Role of C-reactive protein in complement-mediated hemolysis in Malaria [J]. Glycoconj J, 2006, 23(3/4): 233-240.

[10] YU Q, LIN Y, YANG P, et al. C-reactive protein is associated with the progression of acute embolic stroke in rabbit model [J]. J Thromb Thrombolysis, 2012, 33(4): 301-307.

[11] CHAKRABORTY C, AGRAWAL A. Computational analysis of C-reactive protein for assessment of molecular dynamics and interaction properties [J]. Cell Biochem Biophys, 2013, 67(2): 645-656.

[12] HIOKI H, WATANABE Y, KOZUMA K, et al. Effect of serum C-reactive protein level on admission to predict mortality after transcatheter aortic valve implantation [J]. Am J Cardiol, 2018, 122(2): 294-301.

[13] LIU F, CHEN H Y, HUANG X R, et al. C-reactive protein promotes diabetic kidney disease in a mouse model of type 1 diabetes [J]. Diabetologia, 2011, 54(10): 2713-2723.

[14] 霍卫松, 张磊, 高宇哲, 等. 心衰标志物可视化联合检测方法研究 [J]. 影像科学与光化学, 2015, 33(4): 275-284.

[15] YANG Y N, LIN H I, WANG J H, et al. An integrated microfluidic system for C-reactive protein measurement [J]. Biosens Bioelectron, 2009, 24(10): 3091-3096.

(收稿日期: 2019-09-11 修回日期: 2019-12-29)

(上接第 643 页)

[9] 中国医学会检验分会. 新型冠状病毒肺炎病毒核酸检测专家共识 [J]. 中华医学杂志, 2020, 100(2): E003.

[10] 徐万洲, 李娟, 何晓云, 等. 血清 2019 新型冠状病毒 IgM 和 IgG 抗体联合检测在新型冠状病毒感染中的诊断价值 [J/OL]. 中华检验医学杂志, 2020, 43(2020-02-27) [2020-03-01]. <http://rs.yiigle.com/yufabiao/1182736>.

htm.

[11] 石亚玲, 区静怡, 陈星, 等. 多种炎症指标在 2019 新型冠状病毒肺炎的表达水平及临床应用价值 [J/OL]. 中华检验医学杂志, 2020, 43(2020-02-27) [2020-03-01]. <http://rs.yiigle.com/yufabiao/1182737>. htm.

(收稿日期: 2020-03-01 修回日期: 2020-03-09)