

基于胶体金标记银增强的日本血吸虫免疫传感器

张阳德¹, 李玲玲¹, 潘一峰², 陈玉祥², 赵劲风²

1. 中南大学卫生部肝胆肠外科研究中心, 长沙 410008
2. 中南大学卫生部纳米生物技术重点实验室, 长沙 410008

摘要 提出一种高灵敏的、基于银增强放大和免疫胶体金技术压电石英晶体免疫传感器。采用夹心法模式, 在电极表面固定日本血吸虫抗原, 用以捕获血清中的日本血吸虫兔抗血吸虫抗体, 再与胶体金标记的羊抗兔 IgG 二抗形成免疫复合物, 加入银增强溶液, 通过胶体金催化银离子还原, 使大量银沉积在纳米金周围, 提高压电石英晶体免疫传感器的灵敏度。结果表明, 基于胶体金标记银增强的日本血吸虫压电石英晶体免疫传感器, 对兔抗血吸虫抗体具有较高的识别能力, 其操作简单、灵敏度高、线性范围宽、检测下限低。将该方法应用于兔血清中日本血吸虫抗体的测定, 取得了满意结果。

关键词 日本血吸虫; 胶体金; 银增强; 免疫传感器

中图分类号 R318.6

文献标识码 A

文章编号 1000-7857(2010)08-0033-04

Schistosoma Japonium Immunosensor Based on Silver Enhancement and Colloidal Gold Label

ZHANG Yangde¹, LI Lingling¹, PAN Yifeng², CHEN Yuxiang², ZHAO Jinfeng²

1. National Hepatobiliary & Enteric Surgery Research Center, Ministry of Health; Central South University, Changsha 410008, China
2. National Key Laboratory of Nanobiological Technology, Ministry of Health; Central South University, Changsha 410008, China

Abstract A high-sensitivity piezoelectric quartz crystal immunosensor based on silver enhancement and immuno-colloidal gold technique was developed. Using the sandwich method, the Schistosoma japonicum antigen was fixed in the electrode surface for capturing the Schistosoma japonicum antibody, which then was conjugated with the secondary antibody of goat anti-rabbit IgG labeled marked colloidal gold. Through the reaction catalyzed by colloidal gold upper silver ions reduction, a large number of silver deposited on the nano-around gold to enhance the sensitivity of piezoelectric quartz crystal immunosensor. The results show that the piezoelectric quartz crystal immunosensor based on colloidal gold labeling and silver enhancement is simple to operate, with high sensitivity, wide linear range, and low detection limit. The method has been applied to the rabbit serum antibodies in the determination of Schistosoma japonicum, and satisfactory results have been achieved.

Keywords Schistosoma japonicum; nanogold; silver enhanced; immunosensor

0 引言

日本血吸虫病是亚洲地区流行的一种寄生虫病, 对人体危害极大。近年来, 日本血吸虫病的免疫学诊断取得了显著

进展。为提高免疫检测灵敏度, 出现了酶放大^[1-2]、纳米颗粒标记的荧光免疫分析^[3]、纳米颗粒的银增强^[4-5]、脂质体放大技术^[6]、及 DNA/RNA 检测技术^[7-8]等多种检测方法。血吸虫的诊断虽取

收稿日期: 2009-11-23

作者简介: 张阳德, 教授, 研究方向为纳米生物技术, 电子信箱: lililingling821@126.com; 赵劲风 (通信作者), 研究方向为纳米生物技术, 电子信箱: zhaojinfeng@hotmail.com

得了很大进步,但还不能完全满足实际需要,亟须建立简便、快速、高灵敏度的检测血吸虫病测定方法。

压电免疫传感器是近年兴起的一类新传感装置,是把抗原与抗体反应的特异性和石英谐振换能器对表面质量负载变化的高度敏感性相结合发展起来的一种新型免疫传感器,具有设备简单、测量灵敏度高、特异性好、响应速度快、不需任何标记、操作简单等特点^[9-10]。抗体或抗原作为大分子蛋白质固定在石英晶体电极表面,通过抗原抗体的特异性结合,其复合物易导致晶体表面显著的质量变化,灵敏度高。本研究研制一种基于银增强放大的压电石英晶体免疫传感器,以期建立一些高灵敏、高特异、简便易行、能适应于现场应用及疗效考核的新型日本血吸虫诊断技术。

1 试剂与仪器

1.1 试剂

氯金酸(上海诚心化工);二水合柠檬酸钠(国药集团化学试剂有限公司);硝酸银(国药集团化学试剂有限公司);日本血吸虫卵抗原、兔抗血吸虫抗体、不同感染程度的日本血吸虫兔血清样本(中南大学湘雅医学院寄生虫学教研室提供);羊抗兔 IgG(ProteinTech 公司);试剂均为分析纯,水为 3 次蒸馏水。

1.2 仪器

石英晶体分析仪(瑞典凯戈纳斯有限公司),高速冷冻离心机(美国 Sigma 公司),Cary50 紫外-可见分光光度计(美国 Varian 公司),H-600 透射电镜(日本 Hitachi),CHI660 电化学工作站(美国 CHI 公司),集热式磁力搅拌器(常州荣冠实验分析仪器厂)。

2 实验及结果

2.1 胶体金的制备

采用柠檬酸钠还原法制备胶体金^[12]。取 0.01% 氯金酸水溶液 100mL,于集热式磁力搅拌器上加热至沸腾,在 100r/min 转速下,加入一定量的 1%柠檬酸三钠水溶液。继续加热煮沸 15min,至溶胶颜色呈透明酒红色。室温冷却后以去离子水恢复到原体积,4℃保存备用。

2.2 金标抗体的制备

参照文献^[13],将胶体金溶液加入烧杯中,用 0.1mol/L 的 NaOH 调节胶体金的 pH 值到最适 pH 值(pH=7.8),在搅拌条件下,逐滴加入适量的羊抗兔 IgG 抗体,继续搅拌 10min,逐滴加入 10%BSA 溶液,使体系中 BSA 浓度为 1%。

常温下将金标抗体溶液 3000r/min 离心 15min,弃去沉淀。取红色上清液在 4℃,10000 r/min 条件下高速离心 35min,轻吸弃去上清液;用 0.1% 的 BSA 洗涤暗红色沉淀物 2 次,重复离心 2 次,彻底除去未结合的蛋白质。将沉淀用含 1% BSA 和 0.02 mol/L NaN₃ 的 PBS 混悬为原体积的 1/10,4℃保存备用。

2.3 传感器的制备

石英金片用乙醇、双蒸水仔细清洗,用 Piranha 溶液

(98%,H₂SO₄:H₂O₂=3:1)浸泡 5min,再用蒸馏水、无水乙醇清洗。用超声波清洗 10min,再用双蒸水冲洗干净,晾干备用。

2.4 免疫分析方法

在饱和湿度下,将 10mmol/L N-乙酰半胱氨酸水溶液 20μL 滴于洁净石英金片的金膜表面,室温放置 2h,使其形成单分子层后,用水彻底冲洗,洗去游离 N-乙酰半胱氨酸,趁金表面未干,立即滴加 20μL 100g/L 的 EDC 溶液和 20μL 100g/L 的 NHS 溶液(均以 10mmol/L,pH 7.4 PBS 配制),放置 30min,用 pH 7.4 PBS 冲洗,立即滴加 20μL 0.2g/L 血吸虫抗原溶液,4℃饱和湿度下放置过夜后,用 pH7.4 PBS 冲洗,滴加 20μL 0.1mol/L 乙醇胺溶液(用盐酸调至 pH 8.0),室温放置 1h(封闭尚未反应的活泼酯基团),用水冲洗干净。

取兔抗血吸虫 IgG 抗体 155μL,与制备好的传感器探头混合接触,检测 30min,用 PBS 液冲洗 5 次,持续检测至频率稳定(1min 内频率变化 1Hz)。将包被了羊抗兔 IgG 的石英晶体置于胶体金标记的羊抗兔 IgG 抗体,于 37℃孵育 1h,同上洗涤。将处理好的石英晶体置于干燥室中,待其谐振频率稳定后,测得其频率值 F_1 。加入银增强液(3.5mL 柠檬酸缓冲溶液+1.5mL 的 3.2%对苯二酚溶液+0.1mL 的 1.7% AgNO₃ 溶液),暗处反应 30 min,使银沉积在胶体金上。反应一定时间后,迅速用蒸馏水冲洗,干燥 30min 后测定频率 F_2 。 F_1 与 F_2 的差值即为该浓度兔抗血吸虫 IgG 经质量放大后的频率变化值 ΔF 。

在石英晶体谐振器滴加 Pirmaha 溶液清洗 5min,再用水冲洗干净,吹干,重复上述操作 3 次。

2.5 胶体金的物性分析

2.5.1 紫外可见分光光度计分析

用紫外-可见分光光度计检测所制备胶体金的吸收曲线和吸收峰,初步确定其粒径大小。制备好的胶体金溶液呈酒红色,经紫外可见分光光度计对其进行全波长扫描,在 517nm 有最大吸收峰(图 1(a)曲线),根据粒径与最大吸收波长以及

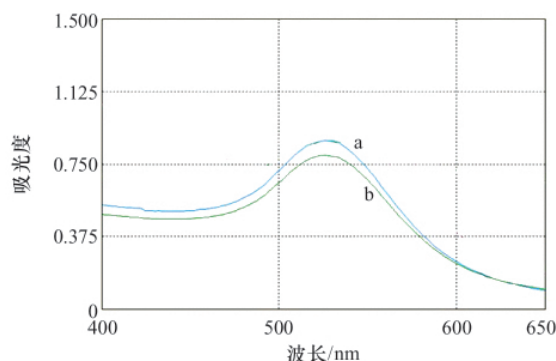


图 1 胶体金及金标记羊抗兔 IgG 紫外-可见吸收曲线

Fig. 1 Determination of nanogold by spectrophotometry

注: a 为胶体金紫外-可见吸收曲线, b 为金标记羊抗兔 IgG 紫外-可见吸收曲线。

Notes: a: UV-visible absorption spectra of nanogold; b: UV-visible absorption spectra of gold labeled goat anti-rabbit IgG.

颜色的关系^[14],可初步判断其粒径在 20nm 左右。对比胶体金标记羊抗兔 IgG 紫外-可见吸收光谱(图 1(b)曲线),吸收曲线在 517nm 处的吸光值降低,可推测血吸虫抗体与胶体金发生了相互作用。同时,吸收曲线的最大峰值发生了 10nm 左右的红移。据文献[15]报道,当胶体金与周围吸附介质或基质材料相互作用时会引起吸收峰发生红移,可初步判定血吸虫抗体与胶体金发生了相互结合。

2.5.2 透射电镜分析

将覆有 Formvar 膜的 300 目铜网浸入胶体金溶液中,取出放在空气中干燥,于透射电镜下观察。测量 100 个胶体金颗粒的粒径,计算平均值及标准差。透射电镜(TEM)扫描图谱所示,制备的胶体金粒子未发生凝聚,颗粒大小均一,且都为比较规整的球形。随机选取 100 个粒子,经过测量计算得到其平均直径为 20nm(图 2)。

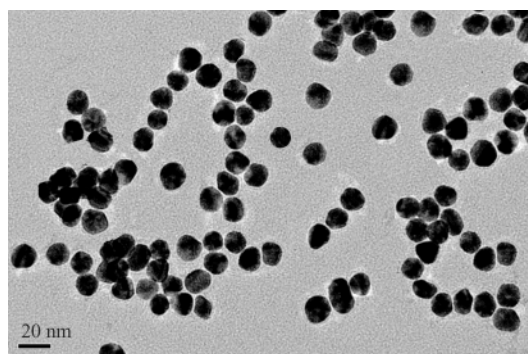


图 2 20nm 胶体金扫描电镜图(200000×)

Fig. 2 SEM image of the nanogold with diameter of 20nm (200000×)

2.6 银增强免疫传感器

2.6.1 日本血吸虫抗原浓度对传感器频率响应的影响

用血吸虫抗原含量不同的一系列溶液构成石英晶片传感器,优化抗原浓度对抗原固定化的影响。如图 3 所示,随血吸虫抗原浓度的增加,传感器频率响应增大,但血吸虫抗原

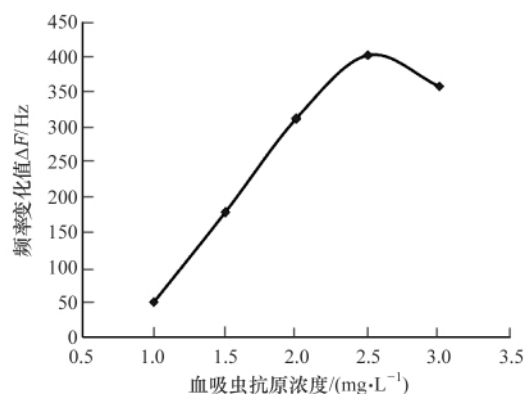


图 3 血吸虫抗原的量对传感器频率响应的影响

Fig. 3 Effect of the amount of *Schistosoma japonicum* antigen on frequency response of immunosensor

量达到 2.5mg/L,免疫反应响应的频移值达到最大值。继续增加抗原浓度,传感器的响应频移值逐渐下降。这是因为晶振表面用于包被抗原的活性位点有限,抗原的浓度达到一定值后,电极表面修饰的日本血吸虫抗原趋向饱和状态,因此选择 2.5mg/L 为标记时的抗原浓度。

2.6.2 抗原抗体免疫反应时间的影响

用 2.5mg/L 分子抗原包被压电石英晶体,在 pH 7.0 的磷酸盐缓冲溶液中,与 3.0 mg/L 兔抗血吸虫抗体(一抗)发生免疫反应,测量其频移值。抗体到达石英晶片表面与固定的抗原发生免疫反应,形成免疫复合物需要一定的时间。如图 4 所示,刚开始的一段时间里,免疫反应使响应频率降低的很快,随后逐渐变慢。抗原抗体反应 30 min 后,频率没有明显下降,表明免疫反应已基本完成。因此,选用 30min 作为样品的检测时间。

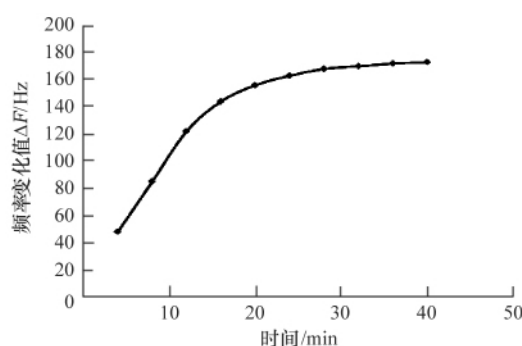


图 4 培育时间对传感器频率响应的影响

Fig. 4 Relationship between frequency change of immunosensor and the incubation time of *Schistosoma japonicum* antibody

2.6.3 金标羊抗兔 IgG 抗体免疫反应时间

考察了金标羊抗兔 IgG(二抗)与兔抗血吸虫抗体(一抗)免疫反应时间对压电石英免疫传感器频移值的影响。40min 后,频移值不再随时间改变。实验中选择 40min 作为金标二抗一抗体免疫反应时间。

2.6.4 银增强反应时间影响

银增强时间强烈影响传感器的频率响应。显然,银增强时间越长,沉积的金属银越多,石英晶体的频率响应值越大。且由于银增强试剂本身自发产生的非特异吸附引起的空白响应会随时间增大而产生较大的背景干扰,故将使检测下限升高。综合考虑传感器高的响应信号、低的检测下限 2 个因素,实验中选择 20min 作为银增强反应时间。

2.6.5 工作曲线及样品测定

在优化的实验条件下,应用传感器测定一系列不同血吸虫抗体浓度下的传感器的频率响应,得到其标准曲线(图 5)。在 0.1~5.0mg/L 的血吸虫抗体浓度范围内,传感器的频率改变值与待测物浓度成线性相关。

使用传感器测量一些感染血吸虫天数不同的兔血清。如

