

纳米金信号放大的 SPR 适配体生物传感器快速检测血小板源性生长因子的研究^{*}

匡红, 曾琳, 刘书蓉, 袁璐, 李金凤, 秦涛, 贾淑芳, 周琳瑶[△] (解放军第四五二医院检验科, 成都 610021)

【摘要】目的 构建一种基于核酸适配子型表面等离子体共振 (SPR) 传感器微阵列与纳米金 (AuNPs) 信号放大技术的高特异性、高灵敏度的可实时在线检测血小板源性生长因子 (PDGF) 的检测技术。**方法** 利用 1,4-苯二硫醇通过自组装技术耦联于生物芯片表面, 然后在生物芯片表面修饰金纳米颗粒, 将采用系统配体进化技术 (SELEX) 筛选得到的 PDGF 适配子处理后固定于 SPR 生物传感器微阵列上成为检测探针分子, 然后将微阵列置于实时在线分析系统上对溶液中的 PDGF 浓度进行实时在线检测; 并优化固定的核酸适配体浓度和固定条件, 进一步研究了该检测方法的稳定性与线性检测范围。**结果** 该新型快速检测方法能够实现 PDGF 的快速实时检测, 稳定性好; 在 0.1~50 $\mu\text{mol/L}$ PDGF 的范围内具有较好的线性, 且最低检测下限可达 0.02 $\mu\text{mol/L}$ 。**结论** 该基于适配体的 SPR 传感器技术具有灵敏度高、稳定性好等优点, 在临床诊断工作中有着广阔的发展前景。

【关键词】 适配体; 表面等离子体共振传感器; 血小板源性生长因子; 纳米金

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.01.007 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)01-0016-03

Aptamer and nanogold based surface plasma resonance biosensor microarray for rapid detection of platelet-derived growth factor^{*} KUANG Hong, ZENG Li, LIU Shu-rong, YUAN Lu, LI Jin-feng, QIN Tao, JIA Shu-fang, ZHOU Lin-yao[△] (452 Hospital of PLA, Chengdu, Sichuan 610021, China)

【Abstract】Objective To construct a highly specific and highly sensitive detection technique for the real-time online detection of platelet-derived growth factor (PDGF) based on nucleic acid aptamer and nanogold (AuNPs) signal amplification technology by using surface plasmon resonance (SPR) microarray sensor. **Methods** 1,4-benzene 2 mercaptan was coupled on the biochip surface by self-assembly method. Then the modified biochip with gold nanoparticles, and immobilized PDGF aptamer screened by SELEX technology on the SPR biosensor micro array as a detecting probe was put in the real-time online analysis system for detecting the PDGF concentration in the solution. The effect of relevant experimental conditions, including the concentration of aptamer and immobilization conditions were investigated and optimized, and the stability of this detection method and the linear range were further studied. **Results** This novel rapid PDGF detection method realized the real time detection of PDGF with a good stability of the detection platform and a good linearity in the PDGF concentration range of 0.1–50 $\mu\text{mol/L}$, its lowest detection limit was 0.02 $\mu\text{mol/L}$. At the same time the detection system had the multichannel parallel detection ability without mutual interference. **Conclusion** This rapid aptamer PDGF detection technique based SPR biosensor possesses the advantages of high sensitivity and good stability, which has broad development prospect in the clinical diagnostic work.

【Key words】 aptamer; SPR biosensor; platelet-derived growth factor; AuNPs

血小板源性生长因子 (PDGF) 是一种最先在血小板中被发现的促有丝分裂剂, 相对分子质量为 $(28\sim 35)\times 10^3$, 是由两条多肽链 (A、B) 连接而成的同型或异型二聚体, 包括 PDGF-AA、PDGF-BB、PDGF-AB 3 种形式^[1]。PDGF 参与多种生理过程的调节, 在胚胎肺分支形态发育和肺组织增殖过程中起重要作用, 与肺脏多种疾病的发生、发展密切相关, 因此对其进行检测具有重要的临床意义^[2]。

传统的 PDGF 检测方法包括酶联免疫吸附试验 (ELISA)、

酶免疫测试 (EIA) 等。近年来也有利用生物传感器检测的方法报道, 但基本都以抗体来实现对目标蛋白的识别。适配体是近年来发现的新型识别体系, 其利用系统配体进化技术 (SELEX) 从核酸分子文库中获得的单链 DNA 或 RNA^[3]。以适配体作为分子识别物质已在蛋白质、小分子药物和无机离子等的检测中得到了广泛应用。

纳米金 (AuNPs) 拥有较大的比表面积, 能够提高检测元件生物分子的固载量, 在分析检测中发挥着越来越重要的作

^{*} 基金项目: 全军医学科技“十二五”科研重点项目 (BWS11J067)。

作者简介: 匡红, 女, 主管技师, 硕士研究生, 主要从事分子生物、生物材料、军事医学研究。

[△] 通讯作者, E-mail: zlyguh123@163.com。

用^[4]。近年来,表面等离子体共振(SPR)技术因能与适配体和 AuNPs 很好的结合使用,受到了广泛的关注,并被认为是生物分子检测的理想检测器件。SPR 基本原理是当金属表面的物质或者物质量发生变化时,其折射率(RI)发生相应的变化,主要表现为共振角的偏移^[5]。利用 SPR 原理设计的生物传感器具有非标记、实时在线检测、再生性能好、样品无需前处理等优点,近来已经成为临床检验领域研究的热点。本研究拟将适配体与 SPR 传感器微阵列技术相结合,利用适配体同靶分子结合的高特异性及与 AuNPs 的信号放大作用,构建一种快速检测 PDGF 的基于 AuNPs 信号放大的适配体型 SPR 生物传感器检测方法。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

SPR 生物传感器(UMPHOA600B 型,购自北京金菩嘉医疗器械有限公司),缓冲液体系(传感器芯片及系统缓冲);Piranha 缓冲液(30% H₂O₂:浓 H₂SO₄=1:3 的比例进行配制);血小板源性生长因子(PDGF-BB),1,4-苯二硫醇,6-巯基-1-己醇(MCH),AuNPs(10 nm)购自美国 Sigma-Aldrich 公司;PDGF 适配体(PBA)为 5'-NH₂-(CH₂)₆-CAG GCT ACG GCA CGT AGA GCA TCA CCA TGA TCC TG-3' 购自大连 TaKaRa 公司;实验所用水均为双蒸水,在使用之前进行超声脱气处理,并用 0.22 μm 微孔滤膜过滤;其他试剂均为分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 生物传感器芯片检测元件的预处理

首先传感器芯片于 piranha 缓冲液浸泡约 15 min,同时于振荡器上轻微振荡,避免芯片表面产生液体气泡,15 min 后用双蒸水充分洗涤。然后将传感器芯片浸置于 HCl 中 10 min 以进一步预处理,稍后用蒸馏水进行洗涤。将传感器芯片置于 2 mL 比例为 V_{98% H₂SO₄}:V_{30% H₂O₂}=7:3 的混合溶液中,40 ℃ 孵育 3 h,以去除芯片上耦联的物质及连接于金膜的所有有机成分,同时定时振荡离心管以除去芯片表面的气泡。之后再将传感器芯片置于同样成分 40 ℃ 混合液中,振荡孵育 3 h。最后以去离子水洗净完全处理好的传感器芯片,氮气吹干,用紫外灯照射 2 min,得到纯金膜传感器芯片,置于 4 ℃ 储存备用^[6]。

1.2.2 AuNPs 与 PDGF 适配子层层自组装

首先将 1,4-苯二硫醇(10 mmol/L)溶解于 36% 乙醇中,然后将制备好的传感器芯片浸置于其中 12 h,再将 AuNPs 溶液振荡混匀,将修饰有 1,4-苯二硫醇的芯片置于 AuNPs 溶液中 12 h,随后依次使用磷酸盐缓冲液(PBS)、蒸馏水冲洗,并用氮气吹干。将 1 μmol/L PDGF 适配子溶于 pH 7.4 的系统缓冲液中,在 85 ℃ 下加热 10 min 后逐渐冷却至室温,以使适配体更容易结合 PDGF^[7]。然后将适配体溶液以 50 μL/min 600 μL 注入修饰好的芯片表面流池。用 1 μmol/L 的系统缓冲液配置好阴性对照后,同样以 50 μL/min 600 μL 注入对照流池。待反应充分完成后,分别以 100 μL/min 的速度注入 0.01% 十二烷基硫酸钠(SDS) 100 μL、5 mmol/L HCl 100 μL 再生液到芯片表面,用以老化芯片表面;然后在 37 ℃ 下,利用 1 200 μL 系统缓冲液以 125 μL/min 速度进入流池平衡芯片表面。

1.2.3 SPR 传感器检测

实验中分别配制终浓度为 0.05、0.1、1、5、10、50、100 μmol/L 的 PDGF 溶液,以及空白对照组

用于该传感器检测性能的研究。首先在流池中注入系统缓冲液,用来校准生物传感器基线,通过调整参数待基线显示稳定后,按照浓度从低到高的顺序依次注入 PDGF 标准溶液,注入的速度为 200 μL/min,注入总量为 2 500 μL。在实验过程中通过 SPR 传感器实时监测软件(GMPT)记录表面等离子共振角度的变化数值。

1.2.4 适配体生物传感器芯片的再生

当使用的 NaOH 溶液浓度过高,会导致芯片表面已经固定的适配体被强行解离下来,导致固定在传感器芯片表面检测适配体数量减少,当在检测下一个样品的时候会影响到检测的灵敏度,并且非特异性吸附会增强,发生再生过程;而再生不完全,就会出现一部分已经结合的 PDGF 还未完全解离下来,可供下次结合的 PDGF 位点就减少了,将可能导致高浓度样品信号比正常检测值偏低的情况从而影响了下次正常的检测。本研究想利用 NaOH 溶液对已经检测使用过的芯片进行再生。作者分别配制 1、2、5 mmol/L 浓度的 NaOH 溶液,根据 PDGF 与适配体结合量的不同的(即 RU 值变化的大小),采用合适浓度与量的 NaOH 溶液^[8]分别对传感器芯片进行再生性能的评估。

1.3 统计学处理

以 SPSS13.0 统计软件处理。各组计量数据采用方差分析,以 $\bar{x} \pm s$ 表示;计数资料以率表示,组间比较用 χ^2 检验;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 AuNPs 适配子 SPR 生物传感器检测平台的构建与表征

构建的 SPR 生物传感器检测平台拥有多通道检测池,可根据情况并行检测 6~8 个标本,并可以根据需要设定 3 个以内的标准点;对样品进样的流动速度可允许的范围为 4~418 μL/min,并可以根据情况将样品流动速度控制在 $\pm 0.5 \mu\text{L}/\text{min}$;该检测平台温度应该控制在室温(即 25 ℃),控制精度为 $\pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ 。实验中将标本溶液逐一通过样本检测池,以此来调节传感器的稳定性。所构建的 AuNPs 适配子传感器微阵列检测平台与 PDGF 结合的检测数据结果显示,当实验时间为 0~800 s 时,基线处于稳定阶段,SPR 角度变化值稳定。当向检测池中加入一定浓度的 PDGF 溶液后,PDGF 与芯片上的适配子发生反应,SPR 传感器检测单元随即检测到 SPR 角度发生了非常明显的改变。从 950 s 开始,SPR 角的变化趋缓,说明 PDGF 与适配子的相互作用进入稳定平衡期且其结合达到了饱和状态。实验中从 2 500 s 开始使 PDGF 与适配子逐步进行解离,向检测池中通入了系统缓冲液,可将仍残存在检测管道且未与适配子结合的 PDGF 进行洗脱,随即 SPR 传感器检测到了 SPR 角度由 70 300 毫度下降至 69 800 毫度。最后计算洗脱后与基线的差值得出了 SPR 角度的变化值。

2.2 AuNPs 适配子 SPR 生物传感器的线性检测范围

使用不同浓度的 PDGF 进行实验,得到不同的 SPR 传感器实时检测结果(图 1)。从曲线图中可以发现,SPR 传感器检测到的 SPR 角度变化值随着靶标物质 PDGF 浓度的逐步变化而发生相应的改变,实验中当作者将 PDGF 的物质浓度从 0.05 μmol/L 逐步递增至 50 μmol/L 时,传感器检测到的光学角度变化值呈现明显的递增趋势,当 PDGF 浓度增加到 100 μmol/L 时,传感器检测的光学角度变化值不再随着浓度的增加而改变,这说明了该 SPR 适配体传感器检测限大致为 0.1~50

μmol/L。

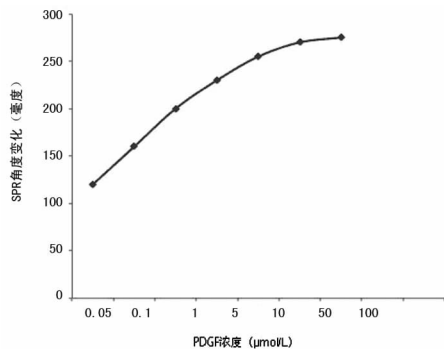


图 1 不同浓度 PDGF 的 SPR 传感器检测结果

2.3 纳米金适配子生物芯片的再生性能 因此根据前期再生条件的摸索,本研究依据传感器检测信号数值的大小来确定较为合适的 NaOH 溶液的浓度,当样品浓度为 3×10^7 CFU/mL 时采用 7 μL 浓度为 1.5 mmol/L NaOH 溶液进行再生,PDGF 与适配体的解离效果最好,再生后 SPR 折射角变化值基本恢复到上一次检测前的基线。再生后的 SPR 折射角变化值与进样检测前检测基线的差值保持在 ±25 RU 以下,该芯片可在此条件和要求下重复使用 40 次以上。

3 讨论

本研究采用了核酸适配体代替传统的抗体与蛋白质结合,并结合高灵敏度的 AuNPs 信号放大技术,成功构建了对 PDGF 实时在线检测的 SPR 生物传感器。SPR 生物传感器方法与传统检测方法相比使用便捷、检测速度快,同时也可连续检测多个样品,检测限可达到目前通用的检测要求,并且通过 NaOH 溶液再生可重复利用芯片 40 次以上,极大地降低了检测成本。

为了提高现有 SPR 生物传感器的检测灵敏度,降低检测限,将纳米技术与 SPR 生物传感器相结合,利用 AuNPs 颗粒生物亲和性好,表面积大、可用于放大信号的特点,将 AuNPs 颗粒固定于生物芯片表面,用于结合更多的核酸适配体,极大地提高了 SPR 生物传感器的灵敏度与检测限。实验结果表

明,该方法检测下限低,线性范围宽,灵敏度高。因此该项技术在蛋白质检测、疾病诊断、发现新药等方面具有非常大的应用价值。

参考文献

[1] 付健,罗文军,孙建明,等. 血小板衍生生长因子 CC 在大鼠静脉血栓溶解过程中的表达及其意义[J]. 解放军医学杂志,2013,38(2):120-124.

[2] 黄雯,朱莹. PDGF 及其受体与肝纤维化的相关性[J]. 世界华人消化杂志,2013,21(9):773-778.

[3] 李晓佩,杨良嵘,黄昆,等. 核酸适配体在生化分离及检测领域中的研究进展[J]. 化工学报,2013,64(1):233-242.

[4] Baratellaa D, Magroa M, Sinigagliaa G, et al. A glucose biosensor based on surface active maghemite nanoparticles[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2013, 45(1): 13-18.

[5] Olaru A, Gheorghiu M, David S, et al. Quality assessment of SPR sensor chips; case study on L1 chips[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2013, 45(1): 77-81.

[6] Situ C, Crooks SRH, Baxterb AG, et al. On-line detection of sulfamethazine and sulfadiazine in porcine bile using a multi-channel high-throughput SPR biosensor[J]. Analytica Chimica Acta, 2002, 473(1): 143-149.

[7] Chen Z, Huang Y, Li X, et al. Colorimetric detection of potassium ions using aptamer-functionalized gold nanoparticles[J]. Anal Chim Acta, 2013, 787: 189-192.

[8] Tran DT, Knez K, Janssen KP, et al. Selection of aptamers against Ara h 1 protein for FO-SPR biosensing of peanut allergens in food matrices[J]. Biosens Bioelectron, 2013, 43(3): 245-251.

(收稿日期:2014-02-24 修回日期:2014-05-12)

(上接第 15 页)

外科患者术后凝血功能的影响[J]. 华中科技大学学报:医学版,2010,39(4):536-539.

[5] 王菲,胡风华,宋国维,等. 简化新生儿危重病例评分法的临床应用评价[J]. 中华急诊医学杂志,2011,20(5):469-472.

[6] 黄坚,曾雪,李成,等. 弥散性血管内凝血患者出凝血分子标志物的检测及其临床价值[J]. 中国老年学杂志,2013,33(15):3558-3559.

[7] Okamoto K, Wada H, Hatada T, et al. Frequency and hemostatic abnormalities in pre-DIC patients[J]. Thromb Res, 2010, 126(1): 74-78.

[8] 姜志凤,宗玮芳,徐叶,等. 不同妊娠期正常孕妇及产科早期 DIC 患者 PT、APTT、TT、FIB、D-D、FM 变化的探讨[J]. 检验医学,2011,26(2):111-113.

[9] 盛伟松. 低分子肝素治疗新生儿硬肿症的疗效观察[J]. 中华全科医学,2009,7(6):573-574.

[10] Seo JW, Kim HK, Kim JE, et al. Prognostic values of the factor Xa-activated clotting time and endogenous thrombin potential in patients suspected of having disseminated intravascular coagulation[J]. Thromb Res, 2009, 123(4): 565-572.

[11] 宋丽,张艳丽,栾斌,等. D-二聚体/FDP 比值在新生儿弥散性血管内凝血前期诊治中的意义[J]. 中国妇幼保健,2012,27(16):2525-2527.

[12] 吴跃进,王振海,冯玲玲,等. 足月窒息新生儿早期凝血功能及血小板参数的变化[J]. 中国临床实用医学,2009,3(10):36-38.

(收稿日期:2014-04-27 修回日期:2014-10-02)