

A Piezoelectric Schistosoma-Japonicum Immunosensor Based on Self-Assembled Cystamine Film and SiO₂ Nanoparticles*

WANG Xiaorui^{1,2}, ZHANG Yun², ZHANG Yuwei², WANG Hua^{2*}

1. Department of Applied Chemistry, Hunan Chemical Industry Vocation Technology Institute, Zhuzhou Hunan 412004, China;
2. State Key Laboratory of Chemo/Biosensing and Chemometrics,
Chemistry and Chemical Engineering College, Hunan University, Changsha 410082, China

Abstract: A novel piezoelectric immunosensor for Schistosoma-Japonicum (Sj) has been developed, on the basis of a new biomolecular immobilization matrix using self-assembled cystamine film and SiO₂ nanoparticles. The newly prepared SiO₂ nanoparticles exhibited excellent physical and chemical properties, such as high surface-to-area and biocompatibility. After the surface functionalization, they were utilized to load Sj antigens (SjAg) at a larger scale. The formed sensitized nanoparticles of SjAg @SiO₂ were immobilized onto the sensor that was modified with self-assembled cystamine film, resulting in a new piezoelectric immunosensor for detecting Sj antibodies (SjAb). The results showed that the three-dimensional (3D) spacial structures of SiO₂ nanoparticle matrix could facilitate enhanced antigen-antibody immunoreaction, achieving high sensitivity for the detection of SjAb analytes. Under the optimized experimental conditions, the developed piezoelectric immunosensor was proved to be capable of quantitatively determining SjAb in the concentration (dilution ratio) range of 0.6 ~ 22.7 μg/mL with a determination limit of 0.4 μg/mL (S/N = 3). Moreover, the new immunoassay was used for the analysis of clinical samples. It could show favorable performances compared to the classical enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), indicating a promising alternative technique for schistosoma-japonicum in clinical diagnosis, field applications and epidemic situation monitoring.

Key words: SiO₂ nanoparticle; schistosoma-japonicum; biomolecule immobilization; piezoelectric immunosensor

EEACC :7230J

基于胱胺自组装膜和 SiO₂ 纳米颗粒增强效应的日本血吸虫压电免疫传感器的研究*

王潇蕤^{1,2}, 张云², 张玉玮², 王桦^{2*}

1. 湖南化工职业技术学院应用化学系, 湖南 株洲 412004;
2. 湖南大学化学化工学院化学/生物传感与计量学国家重点实验室, 长沙 410082

摘要: 提出了一种基于胱胺自组装膜和 SiO₂ 纳米颗粒增强效应的生物分子固定法, 并将之用于日本血吸虫压电免疫传感器的研究。所制备的 SiO₂ 纳米颗粒具有生物亲和性高和比表面积大等优良理化性能, 经表面功能化后可高效键合日本血吸虫抗原 (SjAg) 分子, 制得敏化的 SjAg @SiO₂ 颗粒。将 SjAg @SiO₂ 固定于修饰了胱胺自组装膜的石英晶体表面, 发展了一种新型压电免疫传感器, 用于日本血吸虫抗体 (SjAb) 的检测。实验结果表明, SiO₂ 颗粒的纳米三维 (3D) 空间结构有利于所固定的抗原对抗体的识别, 进而获得了对目标物 SjAb 的高灵敏检测。所研制的传感器检测感染免血清样中 SjAb 浓度的线性范围为 0.6 ~ 22.7 μg/mL, 检测下限为 0.4 μg/mL (S/N = 3)。此外, 临床实际样品的分析结果表明, 该免疫传感技术的分析检测能力与经典酶联免疫法 (ELISA) 相接近, 可望用于血吸虫病临床生化诊断、现场筛查和疫情监控等。

关键词: SiO₂ 纳米颗粒; 日本血吸虫; 生物分子固定化; 压电免疫传感器

中图分类号: TP212.3

文献标识码: A

文章编号: 1004-1699(2009)02-0160-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (20775020)

收稿日期: 2008-09-05 修改日期: 2008-11-13

日本血吸虫病是一种古老的地方性传染疾病,目前主要流行于中国、菲律宾和印度尼西亚等国家,约有 6.52 亿人口受威胁,成为世界上亟待解决的一个严重公共卫生问题。国内外在日本血吸虫病的实验诊断技术方面已作了许多探索性研究^[1]。然而,相关方法均不同程度地存在分析灵敏度低、需酶或放射物标记、操作繁琐费时等缺陷,尚不能满足当前血吸虫病防治工作的需要。因此,发展一种灵敏、免标记、简便快速的日本血吸虫病生化诊断新方法意义重大。

压电免疫传感器因具有简便、快速、灵敏、成本低、毋需示踪物标记、免样品纯化等诸多优点,被广泛用于各种生化分析^[2-5]。性能优良的免疫材料固定化方法是研制压电免疫传感器的关键。近年来,纳米材料在生物体系的应用引起了人们的普遍关注^[6-8]。其中, SiO₂ 纳米颗粒作为亲水性型材料,具有生物相容性好、比表面积大和物理化学性质稳定(惰性)等特点,同时易于制备和进行功能化处理,从而用作免疫活性物质的载体进行生化检测具有许多优势^[9-11]。本文首次结合脲胺自组装膜将 SiO₂ 纳米颗粒应用于日本血吸虫抗原(SjAg)的高效固定化,发展了一种新的日本血吸虫压电免疫传感器,并将之用于测定一系列感染兔血清样中日本血吸虫抗体(SjAb)。结果表明,该免疫传感技术选择性好,灵敏度高,具有较低的检测下限。此外,将之用于临床实际样品分析,并与经典酶联免疫(ELISA)法进行了比较,结果令人满意。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

压电石英晶体分析仪(QCA, QCA-92 型)为日本 SEIKOEG&G 仪器公司产品;B220S-T 型超声清洗器购于上海必能信超声有限公司;TG16 型台式离心机为长沙平凡仪器仪表有限公司产品;检测池为本室自制;9 MHz, AT-切型镀金压电石英晶体微天平(QCM)购于北京晨星无线电设备厂,处理后的 QCM 一面用。型橡胶圈和塑料片封闭以使之单面触液;磁力搅拌器(Model JB-2)购自上海分析仪器厂;恒温器(Model CSS 501)购于重庆实验器材厂;高频计数器(Model FC 1250)为 Wellstar 公司产品。

正硅酸乙酯(TEOS)购于上海五联化工厂,脲胺和 3-氨基丙基三甲氧基硅烷(APTMS)试剂购于 Sigma-Aldrich 公司;氨水(30%)、乙醇、甲醇和聚乙二醇(PEG, MW 6.0 kD)均为天津天泰精细化工产品;戊二醛(GLU)购于武汉有机化学试剂公

司;日本血吸虫 32 kDa 分子抗原(SjAg, 4.2 μg/mL)按文献[12]方法由分离纯化日本血吸虫成虫抗原制得;日本血吸虫抗体(SjAb, 2.0 μg/mL)系纯化日本血吸虫感染兔血清的免疫球蛋白制得;临床血吸虫样品由中南大学湘雅医学院寄生虫教研室提供;牛血清白蛋白(BSA)为上海申索生物制品有限公司产品;不同 pH 值的 PBS 溶液采用 0.010 mol/L Na₂HPO₄ 和 0.010 mol/L KH₂PO₄ 配制;Piranha 试剂为按 3:7 配制的 H₂O₂-H₂SO₄ 混合液;其它试剂均为分析纯,所用水均为二次蒸馏水。

1.2 SiO₂ 颗粒的制备与标记

1.2.1 SiO₂ 颗粒的合成、硅烷化和 SjAg 的标记

按文献[13]报道的方法,以 PEG 为分散剂,通过氨水催化正硅酸乙酯(TEOS)水解制备 SiO₂ 颗粒。将制得的 SiO₂ 颗粒依次采用乙醇、水进行超声洗涤并离心分离后,对 SiO₂ 颗粒进行硅烷化:取一定量(~1.0 g) SiO₂ 颗粒悬混于 10 mL 甲醇中,加入 0.50 mL APTMS,于室温下搅拌反应 12 h,离心分离,然后依次采用甲醇和 PBS 溶液(pH 7.0)进行超声洗涤并离心分离,即完成 SiO₂ 颗粒的氨基硅烷化,将之移入 PBS 溶液(pH 7.0,含 1.5% PEG),于 4℃ 冰箱中保存。

取 10 mL 氨基硅烷化的 SiO₂ 颗粒悬浊液,超声分散后加入 5.0 mL 2.5% 戊二醛,于室温下搅拌反应 3 h,再离心分离,即完成颗粒的醛化。将醛化 SiO₂ 颗粒悬混于 4.0 mL PBS 溶液(pH 7.0),超声分散后加入 1.0 mL SjAg(4.2 μg/mL),于室温下搅拌反应 3 h,离心分离,即制得 SjAg@SiO₂ 颗粒。最后悬混于 5.0 mL PBS 溶液(pH 7.0,含 1.5% PEG),于 4℃ 冰箱中保存。

1.3 脲胺膜的组装

移取 30 μL 脲胺溶液(20 mg/mL)滴加于洗净的压电晶振表面,于 37℃ 下温育 30 min,水洗,晾干备用。

1.4 SjAg@SiO₂ 的固定化

移取 30 μL SjAg@SiO₂ 悬浮液滴加修饰了脲胺膜的压电晶振表面,于 37℃ 下温育 40 min,取出,水洗两遍,晾干;再滴加 30 μL BSA 溶液(10 mg/mL)于晶振表面,于 37℃ 下温育 30 min,以封闭其表面上的非特异性活性位点,水洗,晾干备用。

1.5 检测过程

取 3.0 mL PBS(pH 7.0)溶液于检测池中,安装已修饰 SjAg@SiO₂ 的晶振,开动搅拌器。待响应频率稳定后(<1 Hz/min),移取 15 μL 待测感染兔血清样品,并以 PBS 缓冲溶液(pH 7.0)稀释至

30 μL , 注入检测池中进行检测, 记录免疫反应引起的晶振频率变化至反应结束。所得响应频移值 (F) 与待测样中 SjAb 的浓度成线性关系。

每次检测完毕后, 以 0.10 mol/L 甘氨酸-HCl 溶液 (pH 2.8) 清洗用过的晶振, 以解离 Ag-Ab 键, 实现传感器的再生。经再生使用 4~5 次后, 再以 Piranha 试剂清洗晶振, 以清除其表面吸附的所有物质 (包括胱胺膜、 SjAg@SiO_2 和 SjAb 等), 水洗两遍, 再经重新固定化修饰, 即可实现传感器的反复使用。

2 结果与讨论

2.1 抗原分子的固定化

考察了 SjAg@SiO_2 用量和温育时间对 SjAg 固定化的影响, 结果分别如图 1、图 2 所示。由图 1 可知, 随着 SjAg@SiO_2 用量浓度从 5 μL 增加到 30 μL , 传感器的响应频移值随之从 142 Hz 增加到 267 Hz。然而, 继续增加 SjAg@SiO_2 用量, 即大于 30 μL , 传感器的响应频移值逐渐下降。这是因为传感器表面用于包被 SjAg@SiO_2 的活性位点有限, SjAg@SiO_2 的浓度增大到一定值时, 胱胺膜上 SjAg@SiO_2 即达到包被平衡状态。图 2 显示了温育时间对 SjAg 固定的影响。从图 2 可以看出, 传感器的响应频移值随着温育时间的增加而增加, 至温育时间为 50 min 时趋于稳定。合适的温育时间, 可使传感器上包被的活性分子排列有序, 空间位阻小, 从而有利于免疫反应的发生^[14]。

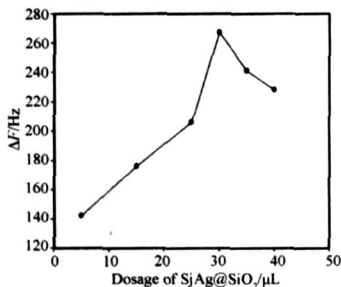


图 1 SjAg@SiO_2 用量对 SjAg 固定化的影响

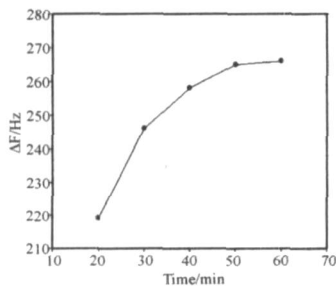


图 2 温育时间对 SjAg 固定化的影响

2.2 免疫反应条件的优化

实验通过改变检测缓冲液的 pH 值考察了酸度

对免疫反应的影响 (图 3)。由该图知, 适于免疫反应的 pH 值范围为 6.5~7.4, 并以 pH 7.0 时反应响应的频移值最大, 这与常规免疫反应所要求的中性条件相一致。这是因为抗原和抗体为两性蛋白质, 在 Ag-Ab 相互作用中其静电量和性质均与 pH 值关系密切, 并以中性环境下二者间的库仑结合力最大^[15]。此外, 免疫反应对环境温度有一定程度的依赖性。实验通过传感器在不同的环境温度条件下检测抗体, 考察了环境温度对免疫反应的影响 (数据未显示)。结果发现, 在室温 (25 $^{\circ}\text{C}$) 下, 所研制的传感器即表现出较佳的分析检测性能。考虑到传感器的实用性和分析方法的简单化, 本实验均在室温 (25 $^{\circ}\text{C}$) 下进行。

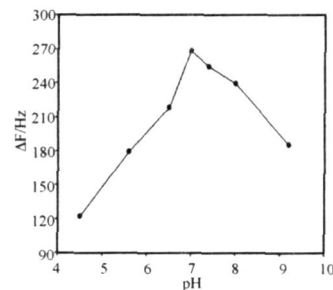


图 3 检测液 pH 值对 SjAg 测定的影响

2.3 实时频率响应特征

实验考察了传感器检测感染兔血清样的实时频率响应特征, 并以正常兔血清样作空白 (阴性) 对照 (图 4)。该图显示, 传感器测定感染兔血清样时 (图 4b), 样品中 SjAb 与修饰在传感器表面的 SjAg 发生了特异性的免疫反应, 所引起的压电探针响应频率的变化在开始的一段时间内下降得较快, 随后变慢, 并逐渐趋于平衡。而采用同一压电探针测定正常兔血清样时, 非特异性吸附引起的频率响应没有渐变过程, 而是经过微弱的变化后直接趋于平衡 (图 4a)。同时后者因非特异性吸附引起的频率下降值 (图 4a, ~41 Hz) 3 倍低于后者特异性反应的频率下降值 (图 4b, ~268 Hz), 亦即空白 (阴性) 样的响应值与相应感染 (阳性) 样品的响应值相比可予忽略

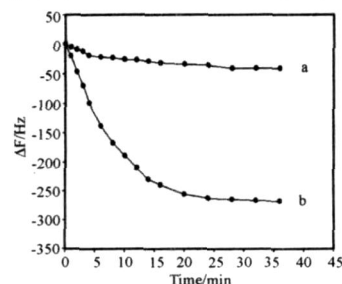


图 4 QCM 免疫传感器的实时频率响应特征

a-检测正常兔血清样 (阴性对照); b-检测感染兔血清样

略。以上结果表明,本传感器具有较高的检测选择性。此外,整个免疫反应时间为~36 min。

2.4 传感器的检测特性

在优化的实验条件下,分别检测了含不同 SjAb 浓度的一系列感染兔血清样,并绘制成响应频移值 (F) 对 SjAb 浓度的负对数值的校准曲线(图 5)。图 5 显示,在 SjAb 浓度为 0.6~22.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内,压电探针的响应频移值与 SjAb 浓度存在良好的线性关系,其敏感下限为 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。此外,考察了该传感器的测定重现性。用修饰 SjAg@SiO₂ 的晶振检测 SjAb 浓度为 1.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的感染兔血清样平行测定 5 次,测得其平均响应频率为 169 ± 28 Hz,相对标准偏差为 11.2%。可见,本传感器具有良好的检测敏感性和重现性。

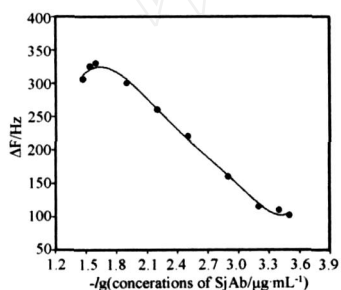


图 5 QCM 免疫传感器的响应频移值 (F) 与 SjAb 浓度的负对数值之间的校正曲线

2.5 压电传感探针的再生

传感器的重复使用性是决定其实用性的重要指标之一^[16]。研究表明,甘氨酸可有效地解离抗原/抗体复合物,使免疫反应结合的抗体从晶振表面脱落^[12]。本实验采用甘氨酸-HCl (pH 2.8) 缓冲溶液作洗脱剂再生传感探针。实验发现,以这种途径再生压电探针,经重复使用 4 次后,其 SjAb 的分析灵敏度仍保持在 90% 以上。

此外,压电探针经循环使用 5~6 次后,若继而应用“Piranha”试剂(按 $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2=7:3$ 配制)清洗,可清除表面吸附的所有有机物,实现探针的完全再生^[7],经重新固定抗原后可用于下一轮检测实验。

2.6 临床样品分析

实验考察了所建立的压电免疫检测技术的实用性。以该传感器检测了 8 份不同 SjAb 浓度的感染人血清临床实际样品,并与经典 ELISA 法进行了结果相关性考察。以 QCM 传感器量测得到的浓度值 (Y 轴) 对以 ELISA 法得到的浓度值 (X 轴) 作图(图 6),由此图可知,所得到的分析结果之间的线性回归方程为 $y = 32.6794 + 1.0066x$,线性相关系数为 0.9894 ($P > 0.05$)。由此可见,二者给出的分析结

果之间呈现高度的相关性,表明这种免疫传感技术可望用于实际样本感染度的定性与定量评估。

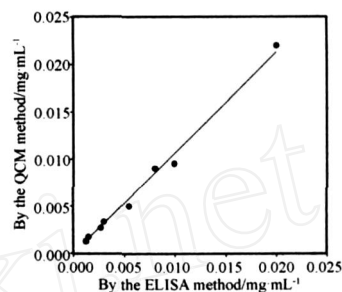


图 6 QCM 免疫传感器与 ELISA 法的分析结果比较

3 结论

本文利用 SiO₂ 纳米颗粒的优良生物分子固定化性能,成功地发展了一种新的高灵敏的压电免疫传感器,用于检测感染兔血清样中的日本血吸虫抗体 (SjAb)。制备得到的功能性 SiO₂ 纳米颗粒具有良好的亲水性和生物相容性,以及大的比表面积与稳定的物理化学性质,将其表面功能化后,可实现对日本血吸虫优势抗原 (SjAg) 的高效固定化,同时 SiO₂ 纳米颗粒的有序三维 (3D) 空间结构有利于免疫反应的发生,可提高对 SjAg-SjAb 的结合效率,实现了对目标物的高灵敏检测。临床样本的实验结果表明,该传感器的分析检测能力与经典 ELISA 法相接近。与常规免疫传感诊断方法相比,这种压电传感新技术具有快速、敏感、操作简单、成本低廉、装置体积小、便于携带等优点,可望用于血吸虫病临床诊断特别是现场筛查和疫情监控等。

参考文献:

- [1] 李允鹤,刘述先,宋昌存等. 寄生虫病免疫学及免疫诊断 [M], 南京:江苏科学技术出版社,1991:122-127, 356-359.
- [2] 姚守拙. 压电化学与生物传感 [M], 长沙:湖南师范大学出版社,1997:393-396.
- [3] Shen Z, Yan H, Parl F F, et al. Recombinant Antibody Piezoelectrochemical Sensors for the Detection of Cytochrome P450 1B1 [J]. Anal. Chem, 2007, 79(4): 1283-1289.
- [4] Rawle R J, Johal M S, Selassie C R D. A real-time QCM-D Approach to Monitoring Mammalian DNA Damage Using DNA Adsorbed to a Polyelectrolyte Surface [J]. Biomacromolecules, 2008, 9(1): 9-12.
- [5] 吴朝阳,何春萍,汪世平等. 基于巯基自组装单层膜的日本血吸虫石英晶体微天平免疫传感器 [J], 高等学校化学学报, 2001, 22(4), 542-546.
- [6] Stoeva S I, Lee J S, Smith J E, et al. Multiplexed Detection of Protein Cancer Markers with Biobarcode Nanoparticle Probes [J]. J. Am. Chem. Soc, 2006, 128(26): 8378-8379.
- [7] Shu X, Chen Y, Yuan H, et al. H₂O₂ Sensor Based on the

- Room-Temperature Phosphorescence of Nano $\text{TiO}_2/\text{SiO}_2$ Composite [J]. *Anal. Chem.*, 2007, 79(10): 3695-3702.
- [8] Boussaad S, Diner B A, Fan J. Influence of Redox Molecules on the Electronic Conductance of Single-Walled Carbon Nanotube Field-Effect Transistors: Application to Chemical and Biological Sensing [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130(12): 3780-3787.
- [9] Kato M, Skair-Kato K, Matsumoto N, et al. A Protein-Encapsulation Technique by the Sol-Gel Method for the Preparation of Monolithic Columns for Capillary Electrochromatography [J]. *Anal. Chem.*, 2002, 74(8): 1915-1921.
- [10] Aslan K, Wu M, Lakowicz J R, et al. Fluorescent Core-Shell Ag@ SiO_2 Nanocomposites for Metal-Enhanced Fluorescence and Single Nanoparticle Sensing Platforms [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129(6): 1524-1525.
- [11] Wang H, Zhang Y, Yan B N, et al. Rapid, Simple, and Sensitive Immunoagglutination Assay with SiO_2 Particles and Quartz Crystal Microbalance for Quantifying *Schistosoma Japonicum* Antibodies [J]. *Clin. Chem.*, 2006, 52: 2065-2071.
- [12] 汪世平, 曾宪芳, 易新元. 日本血吸虫 31/32kDa 抗原纯化及诊断应用的研究 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 1995, 13(1): 25-30.
- [13] Xu H, Aylott J W, Kopelman R, et al. A Real-Time Ratio-metric Method for the Determination of Molecular Oxygen Inside Living Cells Using Sol-Gel-Based Spherical Optical Nanosensors with Applications to Rat C6 Glioma [J]. *Anal. Chem.*, 2001, 73(17): 4124-4133.
- [14] Mutlu S, Saber R, Kocum C, et al. An Immunosensor: Immobilization of Anti-HBs Antibody on Glow-Discharge Treated Piezoelectric Quartz Crystal for HBs-Ag Detection [J]. *Anal. Lett.*, 1999, 32(2): 317-334.
- [15] Atassi M Z, van Oss C J, Absolom D R, et al. *Molecular Immunology* [M]. New York: Marcel Dekker Press, 1984, Chapter 16-18, 22.
- [16] Bunde R L, Jarvi E J, Rosentreter J J. Piezoelectric Quartz Crystal Biosensors [J]. *Talanta*, 1998, 46(6): 1223-1236.



王潇蕊(1970-), 女, 硕士研究生, 主要从事生物传感技术研究;



王 梓(1968-), 男, 博士, 湖南大学化学化工学院副教授, 硕士生导师, 湖南大学化学/生物传感与计量学国家重点实验室成员, 主要从事化学与生物传感技术以及纳米先进功能材料的研究。近年来, 在国内外专业权威学术期刊, 如 *Analytical Chemistry*, *Clinical Chemistry*, *Journal of Materials Chemistry*, *Biomaterials*, *Biosensors & Bioelectronics*, 等发表 SCI 源刊物论文 40 余篇, huawang@hnu.cn