

光学蛋白质芯片法测定甲胎蛋白的初步研究*

黄承洪^{1,2}, 陈艳艳¹, 靳刚^{1,3}

(1.中国科学院苏州纳米技术与纳米仿生研究所, 中国 苏州 215125)

(2.中国科学院研究生院, 中国 北京 100049)

(3.中国科学院力学研究所, 中国 北京 100190)

摘要 采用微流道反应器系统,优化甲胎蛋白单克隆抗体浓度,并装配在醛基改性后的硅片表面上,经牛血清白蛋白封闭后形成检测AFP芯片阵列。通过制作AFP浓度梯度标准曲线标定光学蛋白质芯片,实现肿瘤标志物AFP的检测。结果表明,该方法的最低测定浓度可以达到1.0ng/mL,变异系数为3.1%,回收率在94.4~105.0%之间,与人纤维蛋白原的交叉反应率 $\leq 0.25\%$ 、与1%葡萄糖 $\leq 0.08\%$ 、与人源IgG $\leq 0.16\%$ 和与人血清白蛋白 $\leq 0.20\%$,说明光学蛋白质芯片技术检测AFP,灵敏度高、重复性好、操作简便,有望应用于临床检测。

关键词 光学蛋白质芯片 检测 甲胎蛋白

Initial Research on AFP Determination with Optical Protein-chip

HUANG Cheng-hong^{1,2}, CHEN Yan-yan¹, JIN Gang^{1,3}

(1. Suzhou institute of Nano-tech and Nano-bionics, CAS, Suzhou 215125, China)

(2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

(3. Institute of mechanics, CAS, Beijing 100190, China)

Abstract: With micro-fluidic array system, the concentration of monoclonal antibody (anti-AFP) was optimized, and anti-AFP as ligand was immobilized on the silicon surface modified by glutaraldehyde group and blocked by BSA. Then the microarray for determination of AFP was formed. With the completion of standard curve, the scheme of AFP test was achieved. The result shows the minimum concentration is 1.0ng/ml. The coefficient of variation is 3.1% and the recoveries ranged from 94.4% to 105.0%. The cross-reacting rate for Fib, glucose, IgG and HSA is lower than 0.25%, 0.08%, 0.16% and 0.2%, respectively. The test shows a high sensitivity, good repeatability, and simple manipulation.

Keywords: protein chip detection alpha fetoprotein

中图分类号: Q51 文献标识码: A 文章编号: 1812-1918(2009)02-0017-05

0 引言

肝癌在我国是高发性癌之一。甲胎蛋白(AFP)

是诊断原发性肝癌最有效的辅助性肿瘤标志物^[1,2]。对甲胎蛋白的测定,已经有放射性免疫测定法^[3]、化学发光测定法^[4]等方法,但这些方法都要进行标记,不但实验过程烦琐,而且对操作人员也有毒性,还对环境造成污染。依据椭圆偏振光学原理开发的光学蛋白质芯片是一种光学生物分子分析技

收稿日期 2008-10-11

* 基金项目:国家自然科学基金项目(20845003),中国科学院重要方向性项目(KJ CX2.YW.M02, M04)

术,具有无标记、无扰动、高灵敏和高通量等优点,其基本原理是将具有生物活性的生物分子作为感应分子(即配基)装配在固体表面上,形成生物活性感应膜层,即生物活性探针。当感应表面与含有生物分子的溶液接触时,如果溶液中的生物分子与探针上的配基发生特异性结合,就会生成生物分子复合物,膜层的厚度增加(或表面分子面密度提高),此膜层的变化可以通过椭偏光学成像系统高分辨地观测到。测量结果以灰度图的形式保存下来,这样根据灰度的变化即可判定溶液中是否含有能够与感应分子发生特异性结合的生物分子^{[5]9}。

将多个不同的生物活性探针以阵列式集成在同一基底上。每一个蛋白质微单元阵列对应一种生物活性探针,由此形成多元蛋白质分析技术。利用这种芯片可以完成多个微阵列单元,可以同时进行单样本多种蛋白质检测,也可以实现多样本多种蛋白质同时检测。本文采用微流道反应系统实现 AFP 的多元检测。该系统包含一个 8×6 阵列排列的凹槽,每个凹槽两端开通孔,分别作为液体进口和出口。将该阵列凹槽与硅片表面接触,就会形成一个空腔,即形成了有一进一出的微流道^{[7]8}。该方法可实现多种不同样品的同时检测,且所需样品量较少,每个阵列单元仅需数微升样品。此外溶液的运输、蛋白分子的反应以及清洗等操作均在此系统中完成。

目前,利用此光学蛋白质芯片系统已经成功地实现了对乳腺癌胸苷磷酸化酶⁹、乳腺癌标志物 CA15-3^[10]和噬菌体 M13K07^[11]等的检测。本文应用光学蛋白质芯片技术对肝肿瘤标志物甲胎蛋白的检测进行了初步研究。

1 材料与方 法

1.1 材料及生物试剂

光学蛋白质芯片系统(中国科学院力学研究所研制);甲胎蛋白单克隆抗体(anti-AFP)(购自原子能研究所);甲胎蛋白抗原(AFP)(购自 Biochemistry & Biological 公司);抛光硅片(购自北京有色金属研究院);健康人血清(由苏州市肿瘤医院提供);牛血清白蛋白(BSA) β -氨基丙基三乙氧基硅烷(APTES)和戊二醛(购自 sigma 公司);其余化学

试剂均为分析纯(购自国药集团化学试剂公司)。

1.2 硅片表面处理

把切割成 15mm×10mm 大小的抛光硅片浸泡在体积比为 1:3 过氧化氢(H₂O₂)和浓硫酸(H₂SO₄)的混合溶液中,在摇床上轻微振荡反应 30min,去离子水清洗 3 次,再用无水乙醇清洗 3 次后,把羟基化的硅片浸泡在体积比为 1:15 的 APTES 和无水乙醇的混合溶液中,轻摇振荡反应 2h,无水乙醇清洗 3 次,再用磷酸盐缓冲液(PBS,pH=7.4)清洗 3 次,把氨基化的硅片浸泡在体积比为 1:10 的戊二醛和 PBS 混合溶液中,摇床轻微振荡反应 1h,得到醛基化的硅片, PBS 洗 3 次,最后用 PBS 保存备用。

1.3 抗体浓度的优化

将一系列梯度浓度 0.20、0.10、0.05、0.025 和 0.0125mg/mL 的 anti-AFP,采用微流道技术在醛基化硅片表面上以 1 μ l/min 的速度反应 20min,然后 10.0mg/mL 牛血清白蛋白(BSA)进行封闭,流速 1 μ l/min,反应 40min;最后分别和 25.0ng/mL 的 AFP 反应,流速 1 μ l/min,反应 40min,反应结束后用去离子水以 8 μ l/min 的流速清洗 5min,氮气吹干后在椭偏光学成像系统下检测。同时,设抗体作为对照,根据与抗原结合后灰度值的最大变化确定最优抗体浓度。

1.4 标准曲线及最低检测浓度的确定

采用优化浓度的 anti-AFP 以 1 μ l/min 流速在醛基表面反应 20min,再用 10.0mg/mL 的 BSA 以 1 μ l/min 的流速封闭 40min,制作成 AFP 检测芯片阵列。选取 50.0、25.0、12.5、6.25 和 3.125 ng/mL 浓度的 AFP,分别与检测 AFP 芯片阵列中的 5 个单元进行反应,另选 1 个单元作为空白对照,结果在椭偏光学成像系统下观测,从而获得 AFP 检测用的标准曲线。用去离子水作样本与检测 AFP 芯片阵列反应,重复测定 20 次,计算平均灰度增加值(\bar{y})及标准差(S),以 $\bar{y} \pm 2S$ 代入标准曲线函数式中求得最低检测浓度。

1.5 重复性测定

以 10.0ng/mL 的 AFP 作为待测样本与检测

AFP 芯片阵列中的 20 个单元进行反应, 椭圆光学成像系统下测定各单元的灰度值, 依据标准曲线得到待测样品浓度并计算其平均值、相对偏差以及变异系数。

1.6 准确性检测

取 3 份健康人血清, 分别加入浓度 12.0ng/mL、8.0ng/mL 和 4.0ng/mL 的 AFP 溶液, 与检测 AFP 芯片阵列反应, 椭圆成像系统下测定结果的灰度值。根据灰度值计算加入回收率, 并对上述样品分别进行 90%、60%和 30%稀释, 测定稀释回收率。

1.7 特异性测定

检测AFP 芯片阵列分别与人纤维蛋白原(Fib)、1%葡萄糖、人源免疫球蛋白(IgG)和人血清白蛋白(HSA)等反应。以 25.0ng/mL 的 AFP 为阳性对照, 健康人的血清为阴性对照, 计算交叉反应率。

2 结果与讨论

2.1 抗体浓度的优化

随着 anti-AFP 浓度的增加, 抗体在硅片表面结合的灰度值逐渐增加, 浓度 0.1mg/mL 时逐渐达到饱和; 与 25.0ng/mL 的 AFP 反应, 抗原与抗体结合灰度值也逐渐增加, anti-AFP 浓度在 0.1mg/mL 时逐渐达到饱和, 且此时灰度增加值在系统检测的有效范围内。抗体的浓度超过 0.1mg/mL 后, 其灰度值的增加不明显, 因此, 本文中抗体优化浓度确定为 0.1mg/mL。

2.2 标准曲线与最低检测浓度的确定

不同浓度的 AFP 与检测 AFP 芯片阵列反应后的灰度图见图 1(a), 灰度的增加值见表 1。根据该灰度增加值与对应的 AFP 浓度得到检测 AFP 用标准曲线见图 1(b)。由表 1 与图 1 可以看出, 随着 AFP 浓度的增加, 与检测 AFP 芯片阵列反应后的灰度值也相应增加, 但达到一定程度后, 由于固定抗体的活性位点有限, 因此, 结合 AFP 的量也有限, 最后趋近于饱和状态。标准曲线的函数关系可用 $Y=20.41(1-e^{-0.142x})$ 来表示。用去离子水作样本

与检测 AFP 芯片阵列反应, 重复测定 20 次, 计算得到 $\bar{y}=1.5$ 标准差 $S=0.64$, 以 $\bar{y}+2S$ 代入标准曲线函数式求得最低检测浓度为 1.0ng/mL。

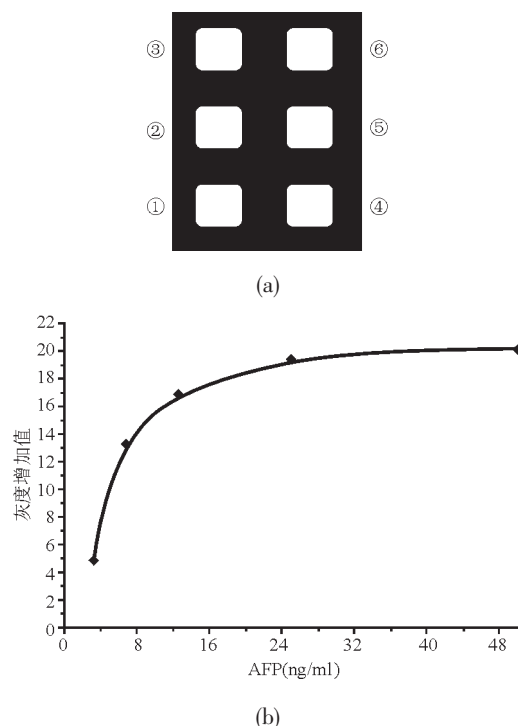


图 1 AFP 和 anti-AFP 反应的标准曲线 a 为椭圆光学系统测定的灰度图 b 为确定的标准曲线 横坐标为灰度增加值, 纵坐标为 AFP 浓度 ①空白对照 ;②3.13ng/mL ;③6.25ng/mL ;④12.5ng/mL ;⑤25.0ng/mL ;⑥50.0ng/mL.

表 1 不同浓度 AFP 与检测 AFP 芯片阵列反应后的灰度增加值

编号	①	②	③	④	⑤	⑥
浓度(ng/mL)	0	3.13	6.25	12.5	25.0	50.0
灰度增加值	0	4.9	13.8	16.9	19.8	20.1

2.3 重复性测定

测得 20 个单元对应的 AFP 浓度值分别为 9.8、9.8、11.0、10.2、10.1、10.4、10.2、10.0、10.3、9.9、10.0、10.1、10.4、9.6、10.1、9.9、10.2、10.4、10.5 和 9.9 ng/mL, 经过计算, 平均值为 10.08ng/mL, 绝对偏差为 3.14, 变异系数为 3.1%。

2.4 准确性检测

测得 12ng/mL、8ng/mL 和 4ng/mL 三个浓度的加入回收率分别为 95.0%、105.0%和 105.0%, 加

表2 加入回收率和稀释回收率测定结果

加入回收率			稀释回收率			
加入浓度(ng/mL)	回收浓度(ng/mL)	回收率	稀释倍数	预期浓度(ng/mL)	实测浓度(ng/mL)	回收率
4.0	3.8	95.0%	90%	3.6	3.4	94.4%
			60%	2.4	2.3	95.0%
			30%	1.2	1.2	100.0%
8.0	8.4	105.0%	90%	7.2	7.3	101.0%
			60%	4.8	4.7	97.9%
			30%	2.4	2.3	95.8%
12.0	12.6	105.0%	90%	10.8	11.0	102.0%
			60%	7.2	7.3	101.0%
			30%	3.6	3.8	105.0%
平均		102%	平均		99.1%	

入平均回收率 102% ;再分别对上述浓度稀释后测定稀释回收率的范围从 94.4-105.0% , 平均 99.1% ,详细结果见表 2。

2.5 特异性测定

检测结果见图 2。经计算,制作的检测 AFP 芯片阵列与人纤维蛋白原的交叉反应率 $\leq 0.25\%$ 、与 1%葡萄糖 $\leq 0.08\%$ 、与人源 IgG $\leq 0.16\%$ 和人血清白蛋白 $\leq 0.20\%$ 。

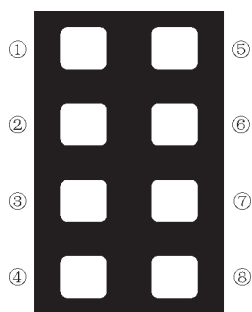


图2 检测 AFP 芯片阵列特异性检测结果

① 阳性对照 ;②1.0%BSA ;③1.0%IgG ;④阴性对照;
⑤空白对照; ⑥1.0%葡萄糖; ⑦1.0%HSA; ⑧ 1.0%fib

3 结论

甲胎蛋白 (AFP) 是最常用的肿瘤标志物之一,也是肝癌早期诊断最有效的肿瘤标志物。本研究采用光学蛋白质芯片检测 AFP, 检测灵敏度高,最低可达到 1.0ng/mL。该方法把抗体直接固定在经过改性的醛基表面,无需进行标记,克服了标记

检测方法会损伤生物分子活性的缺点,不但操作简单,而且高通量检测可同时进行多样本分析。此外,其敏感性、特异性、准确性均可满足常规临床检测的需要,因此可望用于疾病检测。

参考文献

- [1] 丛文铭 我国肝胆系统肿瘤病理学研究的回顾和展望[J].中华肿瘤预防杂志 15(2) 2008 81-8.
- [2] 冯艳蓉 马俊芬 甲胎蛋白化学发光免疫定量分析方法的建立[J]. 第四军医大学学报 28(14) 2007 ;1291-1293.
- [3] P. C. W. Lai, D. M. Hay, F. L. Lorscheider Radioimmunoassay of ovine alpha-fetoprotein [J].Journal of Immunological Methods, Volume 20, April 1978, Pages 1-10.
- [4] Norihiro Nashida, Wataru Satoh, Junji Fukuda Electrochemical immunoassay on a microfluidic device with sequential injection and flushing functions [J]. Biosensors and Bioelectronics 22 (2007) 3167-3173.
- [5] Jin G, P Tengvall, I lundstrom, H Arwin A biosensor concept based on imaging ellipsometry for visualization of biomolecular interaction [J] Anal.biochem.1995, 232-69-72.
- [6] Jin G. Development of biosensor based on imaging ellipsometry[J]. phys. stat. sol. (a)205, No. 4,810-816(2008)/ DOI 10. 1002/pssa. 200777810.
- [7] 陈艳艳 靳刚 实时光学蛋白质芯片生物传感器[J]. 纳米科技 2006,6,33-36.
- [8] Jinpian Diao, Da -cheng Ren, James R. Engstrom,

(下转第 65 页)

3 结论

1)Ag 掺杂后 ZnO 纳米线对四种气体的最高灵敏度分别提高了 230%、92%、158%、49% ;

2)Ag 掺杂后 ZnO 纳米线对四种气体的响应时间分别缩短了 3s、2s、4s、4s ,恢复时间缩短了约 3s ;

3)Ag 掺杂后 ,纳米线的直径减小 ,表面积增大 ,从而提高了 ZnO 纳米线的气敏性能。

参考文献

[1] 于海蔚,刘建周,刘军,等.CH4 与 CO 检测气敏元件中催化剂的制备与反应性能研究 [J]. 工业催化.2005,3 (12):62-65.

[2] WAN Q,LI Q H,CHEN Y J,et al. Fabrica tion and ethanol sensing characteristics of ZnO nanowire gas sensors[J]. Applied Physics Letters ,2004 ,84(18) 3654.

[3] FAN Zhi -yong,WANG Dawei,Chang Pai -Chun,et al. ZnO nanowire field-effect transisitor and oxygen sensing property [J]. Applied Physics Letters ,2004 ,85(24) : 5923.

[4] M.S.Wagh,L.A.Patil,Tanay Seth, et al.Surface Cupric SnO₂-ZnO Thick Films as a H₂S Gas Sensor[J]. Materials Chemistry and Physics,2004,84:228-233.

[5] G.S.Wu,Y.L.Zhuang,Z.Q.Lin,et al Synthesis and photoluminescence of Dy-doped ZnO nanowires[J].Physicae , 2006(31):5-8.

[6] ZHOU Shao-Min, ZHANG Xiao-Hong, MENG Xiang-Min,et al,Preparation and photoluminescence of Sc-doped ZnO nanowires[J]. Physicae ,2005(25) 587-591.

[7] 陈艾.敏感材料与传感器[M].北京:化学工业出版社. 2004:177-212.

[8] 姚敏瑛.SnO₂ 纳米粉体制备及其气敏特性研究[D].太原:太原理工大学硕士学位论文,2002.

[9] 张立德,牟季美.纳米材料和纳米结构[M].北京:科学出版社,2001:287-309.

[10] 许并社.纳米材料及应用技术[M].北京:化学工业出版社,2003:102-107.

作者简介

范新会(1965-),男(汉族),博士,西安工业大学教授。从事纳米材料及气体传感器方面的研究。

(上接第 20 页)

Kelvin H. Lee A surface modification strategy on silicon nitride for developing Biosensors [J]. Analytical Biochemistry 343 (2005) 322-328.

[9] 李爱玲 李宏伟 张静 光学蛋白质芯片检测乳腺癌组织中胸苷磷酸化酶的临床初探[J]. 中国微循环 8(4) ; 2004 257-260.

[10] Hong-Gang Zhang, Cai Qi, Zhan-Hui Wang Evaluation of a new CA15-3 protein Assay Method: optical protein-chip system for clinical application [J]. Clinical Chemistry 51,No.6.2005,1038-1040.

[11] 齐财 冯静 王战会 光学蛋白质芯片技术在噬菌体 M13K07 检测中的应用 [J]. 生物工程学报 22(5), 2006, 856-860.

作者简介

黄承洪 男,汉族,在读博士,研究方向为蛋白质芯片。

陈艳艳 女,副研究员,主要研究方向为生物传感器和纳米尺度薄膜表征技术。

靳 刚 男,研究员,博士生导师。法国巴黎皮埃尔居里大学物理学博士。现任中国科学院力学所研究员,中科院基础研究重点发展战略规划专家(纳米材料和纳米器件)等。完成国家自然科学基金项目和中科院重点、重大项目多项,发展了以蛋白质芯片为敏感元件的光学生物传感器。主要研究方向为纳米光学技术,包括表面材料科学,二维纳米生物构造,蛋白质芯片技术和纳米尺度光学成像技术等。

美科学家用纳米技术增强飞机外壳强度

美国科学家最新研究出一种用碳纳米管“装订”航空材料的技术,可以在略微增加成本的情况下使飞机外壳强度提高到原来的 10 倍。麻省理工学院航空航天学系的科学家介绍说,除了强度高,用碳纳米管强化过的航空复合材料还具有更好的导电性,用这种材料制造的飞机可以更好地抵抗雷电袭击。

麻省理工学院科学家在研究过程中使碳纳米管与碳纤维层垂直排列,然后对碳纤维层之间的聚合物进行加热,液化后的聚合物会将碳纳米管吸收进去,起到“装订”碳纤维层的作用。碳纳米管直径只有几纳米,是碳纤维直径的千分之一,所以不会破坏碳纤维,而是填充纤维之间的空隙,使材料变得更坚固。科学家说,用于“装订”的碳纳米管重量只占复合材料总重的 1%,复合材料的成本也只增加百分之几,强度和抗雷电能力却会大大增强。

来源 新华网