

检测 H5 亚型禽流感的压电免疫传感器的研究 *

刘靖清¹ 卞红春¹ 胡云发³ 王新卫² 陈枝楠³ 陈 勇³ 詹爱军^{3△}

(1 盐城市农业委员会 江苏 盐城 224000 2 河南农业大学牧医工程学院 河南 郑州 450002 ;

3 深圳市检验检疫科学研究院 广东 深圳 518010)

摘要 目的 : 为研制检测 H5 亚型禽流感的压电免疫传感器。方法 : 用巯基丙酸在镀银电极石英晶体自组装巯基丙酸单分子膜再通过 N- 乙基 -N' -(3- 二甲氨基)丙基碳化二亚胺盐酸(EDC)和 N- 羟基琥珀酰亚胺(NHS)偶联抗 H5 亚型禽流感病毒的特异性单抗构建传感器芯片 ,建立了可以检测 H5 亚型禽流感病毒的免疫传感器。结果 : 结果表明 ,该法具有较好的特异性 ,不与 H9 亚型流感病毒和 NDV 反应 ,检测灵敏度达到 10-50 个 EID₅₀。结论 : 本文结果为检测禽流感病毒免疫传感器的进一步深入研究奠定了基础 ,这为其它相关病毒的监测提供了一种新途径。

关键词 压电免疫传感器 ;生物自组合法 ;H5 亚型禽流感病毒

中图分类号 :S855.3 文献标识码 :A 文章编号:1673-6273(2011)20-3838-03

Study on Piezoelectric Immunosensor for the Detection of H5 Sera-subtype Avian Influenza*

LIU Jing-qing¹, BIAN Hong-chun¹, HU Yun-fa³, WANG Xin-we², CHEN Zhi-nan³, CHEN Yong³, ZHAN Ai-jun^{3△}

(1 Yancheng Agriculture Committee, 224002, China 2 College of Animal Husbandry and Veterinary, Henan Agricultural University, Zhengzhou Henan 450002 China 3 ShenZhen Academy of Inspection and Quarantine, Shenzhen, 518010 China)

ABSTRACT Objective: The aim is to develop the piezoelectric immunosensor to detect H5 avian influenza (AI). **Methods:** Set up the immunosensor by self-assembling Mercaptopmpionic acid(MPA) to be monolayer on the silver-coated electrode of quartz crystal and coupling the monoclonal antibody to H5 AIV with N-ethy-N' -(3-dimethyl aminopropyl)carbodiimide hydrochloride(EDC) and N-hydr oxysuccinimide (NHS),the chip of immunosensor to detect H5 AIV was established. **Results:** The results showed that the immunosensor displayed better specificity to H5 AIV and no respond to H9AIV and NDV when being used for detection. The sensitivity test indicated the detecting limit for the H5 AIV could reach to 10-50 EID₅₀. **Conclusion:** The method provided a foundation for further research on immunosensor for detecting AIV and it could be a new exploration to detect other viruses with the same technique in animal husbandry.

Key words: Piezoelectric immunosensor; Biological self-assembly method; H5 sera-type avian influenza virus

Chinese Library Classification(CLC): S855.3 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)20-3838-03

禽流感是由 A 型流感病毒引起的一种禽类感染的疾病综合症。国际兽医局(OIE)规定该病为 A 类烈性传染病^[1],我国农业部 2008 年 12 月发布的 1125 号公告《一、二、三类动物疫病病种名录》也将其列为一类动物疫病。该病不但严重危害家禽健康 ,也可感染人 ,具有重要的公共卫生意义^[2-3]。在禽流感防控中 ,快速准确的检测尤为重要。AI 监测方法包括传统方法与分子生物学方法^[4-8],传统方法主要有病毒分离培养和血清学诊断 ,其不足之处在于操作繁琐和结果重复性不好等。分子生物学方法如 RT-PCR 与基因芯片技术等也被应用于检测 AIV ,具有特异、敏感、简便快捷等特点,但对实验条件要求高 ,所需仪器设备昂贵 ,不易在基层兽医部门推广。因此研究新型的 AIV 检测方法仍然是热点之一。

压电石英晶体免疫传感器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。该法具有设备简单、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,目前已经发展到直接在液相中检测,实现了实时检测^[9-10]。笔者之前也探索了用蛋白 A 将抗 H9 亚型禽流感病毒血凝素特异性的单克隆抗体定向固定在石英晶体表面制成可以检测 H9 亚型禽流感病毒压电免疫传感器^[11],本研究旨在用抗禽流感 H5 亚型血凝素特异性的单克隆抗体用生物自组合法与石英晶片制成压电免疫传感器,研制可用于快速准确诊断 H5 亚型禽流感病毒的新型免疫学检测方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

压电芯片蛋白测定仪由佛山分析仪器有限公司提供;AT 切割的 10MHz 表面镀金石英晶体购自深圳清华力合传感有限公司 ;

* 基金项目 : " 十一五 " 国家科技支撑项目(2006BAK20A29)和广东省科技重大专项计划项目(2004A2090102)资助

作者简介 : 刘靖清(1971-) ,男 ,高级兽医师 ,兽医学硕士 ,现在盐城市农业委员会工作 ,主要从事兽医临床诊疗、动物疫病的实验室监测与诊断研究 ,电话 0515-83709300 ,E-mail ycnwljq@163.com。

△通讯作者 : 詹爱军 ,E-mail zhanaijun@126.com

(收稿日期 2011-04-02 接受日期 2011-04-30)

GSY 电热恒温水浴锅购自上海一恒科学仪器有限公司。

H5 亚型 AIV 单克隆抗体、H9 亚型禽流感病毒、新城疫病毒毒株来自深圳出入境检验检疫局动植物中心动检室；鸡胚购自广东省农科院畜牧研究所；H9 亚型和 H5 亚型 AIV 的标准病毒抗原、阳性血清和阴性血清购自哈尔滨兽医研究所。

牛血清蛋白(BSA)购自晶美生物工程有限公司，3-巯基丙酸(3-Mercaptopropionic acid, MPA 99%)为 Avocado Research Chemical Ltd 产品，N-乙基-N'-(3-二甲氨基)丙基碳化二亚胺盐酸(N-ethy-N'-(3-dimethyl aminopropyl)carbodiimide hydrochloride, EDC)和 N-羟基琥珀酰亚胺(N-hydroxysuccinimide, NHS)是 Sigma 公司产品。其它试剂均为分析纯，所用水均为双蒸水。

1.2 试验方法

1.2.1 生物自组合法:巯基丙酸单分子膜的自组装

1)、新的压电石英晶体芯片分别用丙酮、无水乙醇和双蒸水洗涤后吹干，测谐振频率。

2)、将压电石英晶体芯片置于 0.1%MPA 溶液中浸泡过夜，形成均匀的单分子膜，取出后，用双蒸水细心的冲洗，吹干，测谐振频率。3)、将压膜的石英晶体用 50mg/mL EDC 与 100mg/mL NHS 以 1:1 体积混合液活化 1h（置 37℃ 恒温水槽中），再用双蒸水洗涤 3 次，每次 2 分钟，吹干，测谐振频率。

1.2.2 抗 H5 亚型 AIV 单克隆抗体的包被 将活化的成膜石英晶体电极浸泡于抗 H5 亚型 AIV 单克隆抗体溶液，37℃ 温育 1h，然后用磷酸盐缓冲溶液(PBS pH7.2)洗涤三次，每次 2 分钟，再用双蒸水洗涤三次，吹干，测谐振频率。计算上一步谐振频率与这一步的差值为△F1。

再用牛血清白蛋白溶液(BSA 10 mg/mL)浸泡包被了的晶体，于 37℃ 温育 1h，以封闭晶体表面尚未反应完全的活性基团，再用上法洗涤，吹干，测谐振频率。

1.2.3 免疫传感器测定方法 这种方法的原理如图 1。经过上述步骤后，活化的石英晶体电极浸泡于待检抗原溶液，于 37℃ 条件下温育 1h，再用上法洗涤，吹干，测谐振频率。计算上一步谐振频率与这一步的差值为△F2，分析结果。

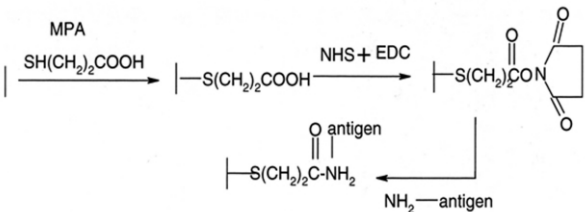


图 1 MPA、EDC 和 NHS 生物自组合法的原理

Fig.1 Modeling of self-assembled monolayer with MPA-EDC-NHS

2 结果

2.1 不同 H5 单克隆抗体浓度对抗体固定量的影响

MPA-EDC-NHS 自组合法固定抗 H5 AIV 单克隆抗体，抗体固定量用频率变化值△F1 表示，抗体浓度与抗体固定量的关系如表 1 所示。从石英晶体的频率变化趋势可以看到，随着抗体浓度的增加，石英晶体频率变化也随之增大，频率变化越大表明抗体固定量越大。

2.2 H5 AIV 传感器的非特异性反应

用制备的压电 H5 AIV 免疫传感器分别检测 H9 AIV 和

表 1 H5 单克隆抗体浓度对抗体固定量的影响(△F1)

Table 1 Effect of different concentrations of H5 monoclonal antibody on frequency shifts

方法 Method	H5 单克隆抗体浓度对抗体固定量的影响 frequency shift(△F1)at different concentrations of H9 monoclonal antibody			
	1:10	1:100	1:1000	1:10000
自组装 MPA-EDC-NHS	223.25± 22.93	166.75± 22.57	128.5± 10.66	24.5± 7.767

NDV，测晶体频率的变化△F2 值，传感器的非特异响应见表 2，结果提示，晶体频率的变化△F2 值分别为 22.5 和 18，标准差 S 分别为 6.109、6.683。传感器对 NDV 的非特异反应低于对 H9 AIV 的。以此结果作为阴性对照计算阴阳性的临界值为

△F2+3S，以非特异反应较高的 H9 AIV 的结果为标准，△F2 大于 40.8 判为阳性。

2.3 H5AIV 传感器的灵敏度

自组合法固定 1:100 稀释的抗 H5 亚型 AIV 血凝素单

表 2 H5 AIV 传感器非特异性反应特性

Table2 Nonspecific response activity of piezoelectric H5 AIV immunosensors prepared by MPA-EDC-NHS

方法 Method	H9 AIV		NDV	
	△F2	S	△F2	S
自组装 MPA-EDC-NHS	22.5	6.109	18	6.683

克隆抗体，分别与 5000、1000、200、50、10EID50 的 H5 AIV 反应，病毒含量在 50EID50 以上晶体频率的变化△F2 值均大于 40.8(表 3)，与 20 EID50 的 H9 AIV 反应呈阴性，提示传感器的灵敏度在 10-50 EID50 之间。

2.4 H5 AIV 传感器的温度响应特性

抗原-抗体反应对温度条件要求较高。实验发现，在

20-35℃ 之间，石英晶体振荡频率随温度升高，频率变化迅速增大，温度在 35-37℃ 之间，频率响应最大，表现为晶体频率下降趋势图斜率加大，反应速度加快。当温度超过 37℃ 继续升高时，频率响应却反而减小。反应温度对传感器的频率响应的影响见图 2。

2.5 H5 AIV 传感器的检测时间的测定

2.5.1 抗体固定时间的测定 生物自组装方法固定 H5 AIV 单克隆抗体，时间分别为 15min, 30min, 1h, 2h, 分别测定频率的

表 3 H5AIV 传感器的灵敏度(EID50)
Table3 Sensitivity of piezoelectric H5 AIV immunosensors prepared by MPA-EDC-NHS

方法 Method	敏感性 /Sensitivity of the method				
	5000	1000	200	50	10
自组装 MPA-EDC-NHS	154± 18.31	127.5± 9.88	87.5± 14.39	74.5± 8.06	30.25± 6.95

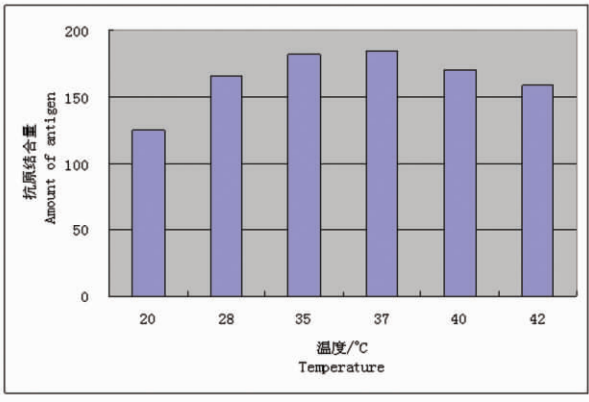


图 2 温度对免疫传感器响应频率的影响
Fig.2 Changes of the resonate frequency shifts of immunosensor at different reaction temperatures

变化 $\Delta F1$ 值。如表 4 所示 ,MPA-EDC-NHS 自组装法固定 30min 已达到饱和。

2.5.2 抗原抗体反应时间的测定 自组装方法固定 H5 AIV 单克隆抗体后与 H5 AIV 反应 15min, 30min, 1h, 分别测定频率的变化 $\Delta F2$ 值。结果如表 5 所示 ,固定 H5 AIV 单克隆抗体膜与抗原的反应时间在 30min 左右。

3 讨论

表 4 不同固定时间对抗体固定量的影响

Table 4 Changes about the amount of immobilized antibody under different coating time

方法 Method	不同时间对抗体固定量的影响 Effect of different coating time on immobilized antibody			
	15min	30min	1h	2h
自组装 MPA-EDC-NHS	81.5	134	131.25	132.5

表 5 反应时间不同对传感器响应频率的影响

Table 5 Changes of the resonate frequency shifts of immunosensor under different reaction time

方法 Method	不同反应时间对响应频率影响 Effect of different time on frequency shift		
	15 min	30 min	60 min
自组装 MPA-EDC-NHS	168. 5	183	184.25

传统的鸡胚分离、血清学诊断技术以及 PCR 等分子生物学诊断技术相比 ,大大缩短了检测时间 ,提高了检测速度 ,为压电免疫传感器走向实用化提供了保证。但需进一步研究该方法与其他方法的比较以及其在实际中的应用价值。

参考文献(References)

[1] Alexander D J. Report on avian influenza in the eastern hemisphere during 1997-2002[J]. Avian Diseases, 2003. 47(Suppl): 792-797
[2] Zambon M C. The pathogenesis of influenza in humans [J]. Rev Med Virol, 2001,11(4):227-41

(下转第 3856 页)

al of Oncology, 2009,15:46-49

- [4] 李建康,和凡,毕惠嫦,等.黄酮类化合物对细胞色素 P450 CYP1A2 的抑制作用及其构效关系研究 [J]. 药学报, 2008,43(12): 1198-1204
LI Jian-kang, HE Fan, BIHui-chang, et al. Inhibition of human cytochrome P450 CYP1A2 by flavonoids: a quantitative structure-activity relationship study [J]. Acta Pharmaceutica Sinica 2008,43(12): 1198-1204
- [5] 谢英明,聂芳红,汤陈坚,等.2,3,7,8-四氯二苯并二噁英和 β -萘黄酮暴露对斑马鱼肝和鳃 MROD 酶活性的影响 [J]. 生态毒理学报, 2009,4(1):142-146
XIE Ying-ming, NIE Fang-hong, TANG Chen-jian, et al. Studies on Hepatic and Branchial MROD Activities in Zebrafish Exposed to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin and Beta-Naphthoflavone [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2009, 4(1):142-146
- [6] Mulcahy RT, Wartman MA, Bailey HH, et al. Constitutive and beta-naphthoflavone-induced expression of the human gamma-glutamylcysteine synthetase heavy subunit gene is regulated by a distal antioxidant response element/TRE sequence [J]. Biol Chem, 1997,272:7445-7454
- [7] Erickson AM, Nevarea Z, Gipp JJ, et al. Identification of a variant antioxidant response element in the promoter of the human glutamate-cysteine ligase modifier subunit gene [J]. J Biol Chem, 2002, 277: 30730-30737
- [8] Rahman I, MacNee W. Lung glutathione and oxidative stress: implications in cigarette smoke-induced airway disease [J]. Am J Physiol, 1999, 277(6 Pt 1):L106721088
- [9] Rahman I, Morris on D, Donaldson K, et al. Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers [J]. Am J Respir Crit Care Med, 1996, 154 (4 Pt 1): 105521060
- [10] 邹国明,李冰,冉丕鑫.人支气管上皮细胞 GCLC 基因调控区 ARE 及 E-BOX 顺式调控元件功能的实验研究[J].中华生物医学工程杂志,2008,24:1543-1548
ZOU Guo-ming, LI Bing, RAN Pi-xin, et al. The study on regulatory function of the cis-regulating elements of ARE and E-box in the human GCLC gene[J]. Chin J Biomed Eng, 2008, 24:1543-1548
- [11] Yuuta F, Yasuteru U, Toru K, et al. Design and synthesis of highly sensitive fluorogenic substrates for glutathione transferase and application for activity imaging in living cells[J]. Am Chem Soc, 2008, 130: 14533-14543
- [12] 陆柏益, 张英, 吴晓琴. 黄酮类化合物的潜在毒性作用[J]. 中国中药杂志, 2006,31(7):533-536
LU Bai-yi, ZHANG Ying, WU Xiao-qin. Advances in studies on potential toxicity of flavonoids [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2006,31(7):533-536
- [13] Yang H, Zeng Y, Lee TD, et al. Role of AP-1 in the coordinate induction of rat glutamate-cysteine ligase and glutathione synthetase by tert-butylhydroquinone[J]. Biol Chem, 2002,277:35232-35239
- [14] Rahman I, Smith CA, Antonicelli F, et al. Characterisation of gamma-glutamylcysteine synthetase-heavy subunit promoter: a critical role for AP-1 [J]. FEBS Lett, 1998, 427(1): 129-133
- [15] Iwanaga M, Mori K, Iida T, et al. Nuclear factor kappa B dependent induction of gamma-glutamylcysteine synthetase by ionizing radiation in T98G human glioblastoma cells [J]. Free Radic Biol Med, 1998, 24(728): 1256-1268

(上接第 3840 页)

- [3] Robert C Moellering, J R. Avian Influenza: the Next Pandemic?[J]. Clinical Microbiology Newsletter, 2006,28(13): 97-101
- [4] Peng Dap-eng, Hu Sishun, Hua Yan, et al. Comparison of a new gold-immunochromatographic assay for the detection of antibodies against avian influenza virus with hemagglutination inhibition and agar gel immunodiffusion assays [J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2007,117:17-25
- [5] Chana K H, Lam S Y, Puthavathana P, et al. Comparative analytical sensitivities of six rapid influenza A antigen detection test kits for detection of influenza A subtypes H1N1, H3N2 and H5N1[J]. Journal of Clinical Virology, 2007,38: 169-171
- [6] Sala G, Cordioli p, Moreno-Martin a, et al. ELISA test for the detection of influenza H7 antibodies in avian sera [J]. Avian Dis, 2003,47:1057-1059
- [7] Spackman E, Senne D A, Myers T J, et al. Development of a realtime reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes [J]. J. Clin. Microbiol, 2002,40:3256-3260
- [8] Cattoli G, Drago A, Maniero S, et al. Comparison of three rapid detection systems for type A influenza virus on tracheal swabs of experimentally and naturally infected birds[J]. Avian Pathol, 2004,33: 432-437
- [9] Piuino P A, Krull U J. Trends in the development of nucleic acid biosensors for medical diagnostics [J]. Anal Bioanal Chem, 2005, 381(5):1004-1011
- [10] Marquette C A, Blum L J. State of the art and recent advances in immunoanalytical systems [J]. Biosens Bioelectron, 2006, 21 (8): 1424-1433
- [11] 詹爱军,王新卫,金鑫,等.蛋白 A 法压电免疫传感器检测 H9 亚型禽流感病毒的研究[J].畜牧兽医学报, 2009, 40(8):1266-1270
Zhan Ai-jun, Wang Xin-wei, Jin Xin, et al. Study on SPA-Piezoelectric Immunosensor for the Detection of H9 Sera-subtype Avian Influenza Virus[J]. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2009, 40(8):1266-1270
- [12] Bandyopadhyay K, Vijayamohan K. Formation of a self-assembled monolayer of diphenyl diselenide on polycrystalline gold[J]. Langmuir, 1998, 14: 625-629
- [13] Flink S, Van Veggel f C J M, Reinhoudt D N, et al. Sensor functionalities in self-assembled monolayer [J]. Adv Mater, 2000, 12: 1315-1328
- [14] Nie Xue-mei, Liu Zhong-ming, Zhang Shui-hua. Development of Piezoelectric Immunosensor for Hepatitis C [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2005, 24(5): 50-52
- [15] Zhang Bo, Fu Weiling, Zhang Xue, et al. A Novel Piezoelectric Tumor Marker Micro-array Immunosensor [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2006, 34(U09):306-310
- [16] Wen Zhi-li, Wang Shi-ping, Shen Guo-li. A Summary Description of Development in Immunosensor [J]. Journal of Biomedical Engineering, 2001, 18(4): 642-646