

· 论 著 ·

固定多黏菌素 B 的压电生物传感器检测内毒素^{*}江奇锋, 陈龙聪, 高 斌, 熊兴良[△]

(重庆医科大学生物医学工程研究室 400016)

摘要:目的 本研究拟探讨快速、定量和灵敏的内毒素(ET)检测方法。方法 通过硅烷化的晶体表面将多黏菌素 B (PMB)固定到 ET 切割 10 MHz 压电石英晶体表面,研制成一种新型的用于检测血浆中 ET 浓度的压电生物传感器。结果 该传感器检测中,ET 在 0.5~20.0 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内有良好的线性关系。结论 该研究探讨了 PMB 浓度、溶液的离子强度和 pH 值以及反应时间等对 ET 吸附性能的影响,检测结果表明该传感器可用于临床和环境检测。

关键词:内毒素;多黏菌素 B;生物传感技术;压电

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.19.001

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)19-2185-03

Detection of endotoxin using polymyxin B-coated piezoelectric biosensor^{*}Jiang Qifeng, Chen Longcong, Gao Bin, Xiong Xingliang[△]

(Laboratory of Biomedical Engineering, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To discuss the rapid, quantitative and sensitive detective method on endotoxin(ET). **Methods** Polymyxin B, which binded with ET, was immobilized onto the silanized modified 10 MHz AT-cut quartz crystal resonator. The biosensor was developed for detection of ET in plasma. **Results** The linear correlation could be obtained from 0.5 to 20 $\mu\text{g/mL}$ of ET for this piezoelectric biosensor. **Conclusion** The effect of concentration of polymyxin B, ionic strength and pH of solution and reaction time on absorption ability, on ET adsorbability was studied. The results suggest the biosensor is potentially useful both in clinical and environmental detection.

Key words: endotoxin; polymyxin B; biosensing techniques; piezoelectricity

内毒素(endotoxin, ET)系革兰阴性细菌细胞壁的产物,其主要成分脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是细菌最主要的表面抗原物质^[1-5]。ET 是造成脓毒症、ET 血症的关键介质,当生物体遭受创伤、烧伤、感染以及进行血液透析、外科手术时特别易于感染而发展为脓毒症。

家兔热源法是最早的 ET 检测方法,由于该方法定量性差、费时等原因有被逐渐淘汰的趋势^[6-7]。国内外现采用的鲎试剂法是半定量法,且存在诸多缺点。近十年不断有 ET 生物传感器研究的报道。目前,压电 ET 生物传感器主要利用 ET 与鲎阿米巴样细胞溶解物(limulus amoebocyte lysate, LAL)凝胶反应过程引起液体流变学性质(黏度和密度)的变化,同时结合压电石英晶体能极其灵敏的响应这一变化的特点检测 ET 的浓度^[8-11]。光学 ET 生物传感器利用荧光标记的 ET 与固定在光学探头上的特异性吸附物质的作用,根据光学参数的变化测量 ET 浓度^[12-14]。上述传感器具有灵敏、快速和定量性好的优点,但同时也存在一些缺点^[6-9]。因此,寻找一种简单、快速、灵敏且定量性好的检测方法在临床医学上有重要的价值。

本文利用多黏菌素 B(polymyxin B, PMB)与 ET 生化反应的特异性与压电晶体质量-频率偏移关系的灵敏性。根据不同 ET 浓度产生的频移不同,即可得到 ET 的浓度。同时还研究了 PMB 与 ET 的最佳结合条件。

1 材料与方

1.1 材料 PMB、ET(来自大肠杆菌 O128:B12)、3-氨基丙基三乙氧基硅烷(3-APTES)以及 N-(3-maleimidobutyryloxy)succinimide(GMBS, 一种交联剂)购于 Sigma 公司。水为实验

室制备的三蒸水。血浆为重庆血站购买的血液经实验室肝素抗凝和离心分离制备。磷酸盐缓冲液(PBS)溶液为实验室制备。其他试剂为分析纯。

1.2 仪器 压电晶体为 AT 切割双面镀金,基频 10 MHz,晶片直径 14 mm,电极直径 8 mm(北京晨晶电子公司)。频率计数器最高分辨率为 0.01 Hz(南京新联电子设备有限公司),由于 ET 在溶液中容易聚合,所以测量池底部采用一电磁搅拌器(金坛大中仪器厂)。实验装置(自制,见图 1)。晶振 1 和晶振 2 分别为测量晶体与参考晶体。采用双晶体是为了抵消液体阻尼效应所产生的附加频移以及测量过程中的温度漂移和时间漂移对测量结果的影响。



图 1 测量系统框图

1.3 PMB 的固定 晶体在固定化前先放入 200 $^{\circ}\text{C}$ 的烘箱 30 min 以确保晶体表面无 ET。然后将晶体依次浸入 1.2 mol/L NaOH 溶液和 1.2 mol/L HCl 溶液各 15 min,清洗后,在晶片表面滴加 1 滴浓 HCl,空气中放置 2 min,接着分别用水和乙醇洗涤干净晶体并晾干。然后将晶体放入 5% 的 3-APTES 丙酮溶液约 1 h,接着在 110 $^{\circ}\text{C}$ 下进行真空干燥 90 min 以提高 3-

^{*} 基金项目:国家自然科学基金资助项目(31201047);高等学校博士学科点专项科研基金联合资助项目(20125503210018)。 作者简介:江奇锋(1981~),讲师,博士,主要从事基于生物传感器的生物活性物质检测、研究;细胞生物学中生物大分子的信号转导等研究。 [△] 通讯作者, Tel: (023)68485446; E-mail: xxlsober@sina.com。

APTES 分子与晶体表面的结合能力,随后用丙酮清洗晶体 6 次。然后将晶体放入 5% 的 GMBS 溶液 (pH 值=7) 中浸泡 1 h,随后用清水洗掉多余的 GMBS。接着用 5 mg/mL PMB 的 PBS 溶液 10 μ L 滴到晶体表面。约 60 min 后,分别用 PBS 和水洗涤晶体,置于 PBS 中备用。

1.4 测量方法 首先测出固定了 PMB 的工作晶体与参考晶体之间的频率差(Δf_1)。然后将工作晶体和参考晶体分别置于一系列不同浓度的 ET 标准溶液和无 ET 标准溶液(用 PBS 和血浆配制)中,于 3 mL 测量池内 35 $^{\circ}$ C 温育 35 min,测出此时工作晶体与参考晶体之间的频差(Δf_2)。则频差 $\Delta f = \Delta f_1 - \Delta f_2$ 反映了 ET 吸附在晶体表面的量,通过制作标准曲线即可获得 ET 浓度与频移值的关系。测试完成后,将已使用过的晶片用生理盐水洗涤 3 次,然后用 0.1% 的胆酸浸泡 10 min,接着用 1N 的氨水洗涤晶体,最后用清水清洗晶体,可解离晶体表面吸附的 ET,从而使传感器可再生使用。

2 结 果

2.1 PMB 与 ET 结合性能的影响因素 实验发现在 ET 浓度低于 mg/mL 数量级时,有 ET 和无 ET 的溶液的黏密度相差甚微,采用双晶体即可抵消这种影响。通过对比 50% 的血浆蛋白溶液与 0% 血浆蛋白溶液的频移差,发现频移值仅 20 Hz 左右,表明该传感器的非特异性吸附很小。所以采用该测量系统可排除上述两种干扰因素的影响 PMB 在医学上被认为是最佳的 ET 吸附和毒性中和物质,但由于其对肾脏和神经系统的毒性而限制了它的全身用药。所以研究固定 PMB 与 ET 最佳结合条件可以优化吸附柱的设计同时可以获得最佳的 ET 测量条件。为此考察了 pH 值、离子强度、温度、反应时间以及 PMB 浓度等的影响。

不同 pH 值下 PMB 与 ET 结合性能的差异,从图中可以看出随 pH 值增大,结合能力下降(图 2)。这主要是由于在酸性介质中,PMB 中有较多的氨基以 $-NH^{+3}$ 形式存在,使晶体表面正电荷密度增大从而与 ET 类脂 A 上带负电荷的 PO_3^{-4} 之间产生强烈电荷吸附。当 pH 值增高时,PMB 的电荷密度减小从而使静电结合能力减弱。在碱性介质中,PMB 的氨基逐步变为 $-NH_2$ 的形式,大大削弱了离子间的相互作用,使 PMB 的吸附作用显著降低。由于在 pH 值 ≤ 5 时,ET 由于碳氢键结合位点上的部分磷酸基质子化,从而减少了 ET 的负电荷密度以及强酸下会造成 PMB 的分子活性下降;加之大部分血浆蛋白的等电点在 pH 值为 4~6。所以综合考虑测量的条件与蛋白的回收,本文选用 pH 值=6 作为反应条件。

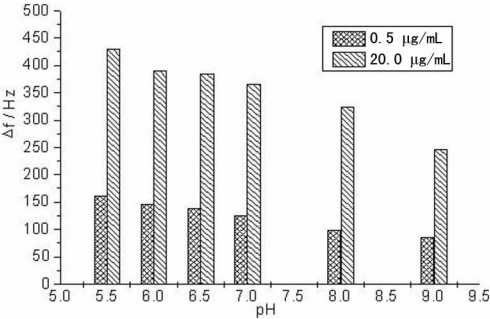


图 2 pH 值对频移的影响

溶液中的离子强度对 PMB 的活性和带电量关系密切。通过改变溶液中的 Na^+ 浓度考察了离子强度的影响(图 3),结果表明,在低离子强度下(≤ 50 mmol/L),ET 与 PMB 的结合性能影响较小,但随离子强度的增加(50~1 000 mmol/L)结合

性能由于受 Na^+ 的电荷屏蔽作用的影响而急剧下降。当离子强度增加到 1 000 mmol/L 以上,离子强度对结合性能基本不产生影响。

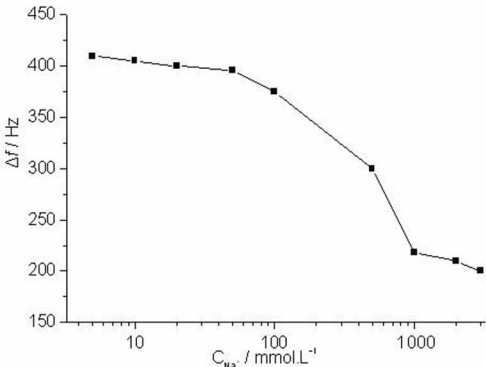


图 3 离子强度对频移的影响

由于任何生化反应对温度存在一定的依赖性,因此考察了温度对结合性能的影响。实验发现在 35 $^{\circ}$ C 左右,频率响应最大。这可能是低温的分子热运动弱,而高温则使 PMB 的活性下降有关。所以实验采用 35 $^{\circ}$ C 作为测量条件。

传感器的响应时间是衡量传感器是否适用的关键因素。图 4 分别给出了该传感器在 20.0 μ g/mL 和 0.5 μ g/mL 下的响应时间。从图中可以发现低浓度或高浓度的溶液,其所需要反应平衡时间则相应长或短。所以本文在测量 ET 的浓度时,均以 35 min 的频移值为测量结果。

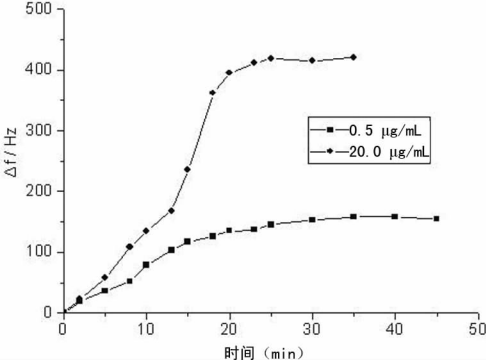


图 4 不同浓度对 ET 的影响时间

在上述优化条件下,采用不同 PMB 浓度固定化的 PMB 对 ET 的结合性能,可以发现在 0.1~5.0 mg/mL 的浓度范围内,随浓度的增加,结合能力不断增加;5~10 mg/mL 内,基本保持不变(图 5)。在 10 mg/mL 以上,随浓度的增加,结合能力不断下降,并没有出现想象的基本维持不变的趋势,就其原因可能与 PMB 的结构有关,随着吸附在晶体表面的 PMB 数量的增加。

2.2 传感器用于检测 ET 浓度 在上述优化的实验条件下。考察了传感器在 ET PBS 溶液和血浆溶液(1:1 稀释)中的响应性能。分别测定了一系列的标准浓度溶液与响应频移值,绘制成曲线(图 6)。在相同的 ET 浓度下,血浆溶液的频移值比 PBS 溶液中的频移值偏小。说明该传感器在用于血浆中 ET 的检测时存在一定的干扰(非特异性吸附)。不过这一干扰引起的频移值仅 20 Hz 左右,即使在检测 0.5 μ g/mL 溶液时,所产生的误差仅有 8% 左右。在高浓度检测时,误差更小。本研究发现,无论在 PBS 还是在血浆中的 ET 的检测范围在 0.5~20.0 μ g/mL 范围内有较好的线性关系(PBS 中: $\Delta f = 143.7 + 238 \log C$; $r = 0.993$ 。血浆中: $\Delta f = 136 + 216.3 \log C$; $r = 0.994$ 。

C 为 ET 浓度)。灵敏度分别为 $23.8 \text{ Hz} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$ 与 $21.6 \text{ Hz} \cdot \mu\text{g}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$, 说明在线性范围内, 该传感器有较好的响应灵敏度。在低浓度 ($<0.5 \mu\text{g/mL}$) 时受传感器的敏感度限制而偏离线性, 在高浓度 ($>20.0 \mu\text{g/mL}$) 时由于可结合位点趋于饱和而偏离直线。在线性范围内, 高、中、低 3 个不同浓度点分别进行 5 次重复测定, 得到相对偏差 (%): 2.5、2.2 和 4.3。说明该传感器有较好的重复性。

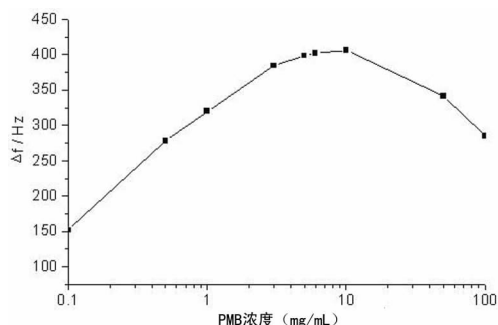


图 5 PMB 固定的浓度优化

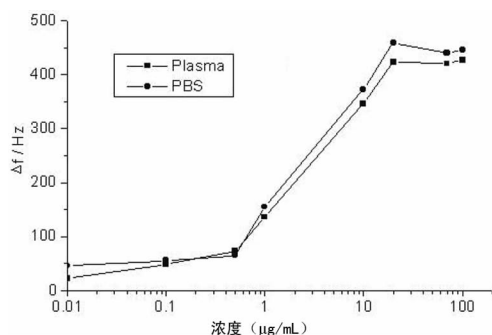


图 6 ET 浓度和响应频移值的校准曲线

2.3 传感器的再生性能 传感器的再生性能是决定传感器实用性和商品化的关键因素之一。采用本文的再生方法, 实验表明传感器每次再生后活性均有小幅下降。使用 5 次后活性将有明显下降。

3 讨论

PMB 是一种阳离子性环状十肽结构, 它是一种两性分子。由于 PMB 与 ET 的类脂 A (lipid A) 部分通过离子和疏水作用而具有高度的亲和结合力^[15]。研究表明, ET 与 PMB 的结合常数高达 $10^8 / \text{mol}^{[9]}$, 对于不同来源的 ET, PMB 与其均具有特异性的亲和作用。

压电石英晶体是一类在化学和生物领域广泛应用的传感器。当在其表面固定能特异性吸附试样中的目标分子的物质时, 晶体表面的固定物由于吸附了目标分子而造成表面质量负载的增加, 从而导致晶体谐振频率的减少。其质量-频率偏移关系式由 Sauerbrey 于 1959 年推出^[12]。

压电 ET 生物传感器结合了压电晶体的高灵敏度质量响应与生化反应的特异性, 是一种很有发展前途的 ET 检测工具。本研究结果表明, 该传感器在检测时间、定量性、易用性以及成本等方面均有一定的优势。通过对不同条件下 PMB 与 ET 结合性能的研究, 对现在正在发展的体外清除重症患者血浆中 ET 的吸附柱的设计也有一定的参考价值。如果将 ET 固定到晶体表面, 可用于研究不同的去除 ET 药物对 ET 结合和毒性中和性能的研究, 从而开发出对人体无害且拮抗效率高的药物。不过就 ET 的检测来说, 提高传感器的灵敏度, 扩大

检测范围, 延长传感器寿命等还需要进一步地研究。

参考文献:

- [1] Liebers V, Raulf-Heimsoth M, Brüning T. Health effects due to endotoxin inhalation[J]. Arch Toxicol, 2008, 82(4):203-210.
- [2] Ong KG, Leland JM, Zeng KF, et al. A rapid highly-sensitive endotoxin detection system[J]. Biosens Bioelectron, 2006, 21(12):2270-2274.
- [3] Gorbet MB, Sefton MV. Endotoxin: The uninvited guest[J]. Biomaterials, 2005, 26(34):6811-6817.
- [4] Hodgson JC. Endotoxin and mammalian host responses during experimental disease[J]. J Comp Pathol, 2006, 135(4):157-175.
- [5] Blatteis CM. Endotoxic fever: new concepts of its regulation suggest new approaches to its management[J]. Pharmacol Ther, 2006, 111(1):194-223.
- [6] Ketchum PA, Novitsky TJ. Assay of endotoxin by limulus amoebocyte lysate[J]. Methods Mol Med, 2000, 36:3-12.
- [7] Ding JL, Ho B. A new era in pyrogen testing[J]. Trends Biotechnol, 2001, 19(8):277-281.
- [8] Kursu O, Kruusing A, Pudas M, et al. Piezoelectric bimorph charge mode force sensor[J]. Sensors and Actuators A: Physical, 2009, 153(1):42-49.
- [9] Yang MX, Chen JR. Self-assembled monolayer based quartz crystal biosensors for the detection of endotoxin[J]. Anal Lett, 2002, 35:1775-1784.
- [10] Ding SJ, Chang BW, Wu CC, et al. A new method for detection of endotoxin on polymyxin B-immobilized gold electrodes[J]. Electrochemistry Communications, 2007, 9(5):1206-1211.
- [11] Bouchet-Spinelli A, Coche-Guérente L, Armand S, et al. Functional characterization of starch-degrading enzymes using quartz crystal microbalance with dissipation monitoring (QCM-D)[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2013, 176:1038-1043.
- [12] dos Santos FC, Goncalves LM, Riccardi Cdos S, et al. Quartz crystal microbalance as a tool for kinetic enzymatic assays by variation of pH[J]. Anal Biochem, 2011, 418(1):152-154.
- [13] Ferrari M, Ferrari V, Kanazawa KK. Dual-harmonic oscillator for quartz crystal resonator sensors[J]. Sensors and Actuators A: Physical, 2008, (145/146):131-138.
- [14] Verissimo MI. Following HPMC gelation with a piezoelectric quartz crystal[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 82:363-369.
- [15] Kim JM, Chang SM, He XK, et al. Development of real-time sensitive chiral analysis technique using quartz crystal analyzer[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2012, 171/172:478-485.