

基于 SPR 生物传感器的 H5N1 流感病毒快速检测方法

王中一 陆兵* 钱军* 李京京 程洪亮 靳晓军

付莹莹 赵宗正 张春茂 郭振东 刘林娜

(军事科学院 军事医学研究院生物工程研究所,北京,100071)

摘要 为利用表面等离子共振(Surface Plasmon Resonance, SPR)生物传感器建立一种快速检测 H5N1 流感病毒的新方法。该研究利用 SPR 生物传感器以及 H5N1 单克隆抗体,对 H5N1 流感病毒样品进行检测分析。结果表明:该方法特性如下:1)可实现针对 H5N1 流感病毒的直接、快速和实时检测,整个过程无需任何标记;2)检测限为 $10^{4.44}$ TCID₅₀/mL,低于 ELISA 方法的 $10^{3.24}$ TCID₅₀/mL;3)在抗体消耗量方面,SPR 技术要优于 ELISA 技术近 100 倍。

关键词 H5N1 流感病毒;表面等离子共振;生物传感器;快速检测

中图分类号 Q939.99

文章编号 1007-4333(2019)01-0076-06

文献标志码 A

Rapid and sensitive detection of H5N1 virus based on surface plasmon resonance (SPR)

WANG Zhongyi, LU Bing*, QIAN Jun*, LI Jingjing, CHENG Hongliang, JIN Xiaojun,
FU Yingying, ZHAO Zongzheng, ZHANG Chunmao, GUO Zhendong, LIU Linna

(Institute of Biotechnology Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 100071, China)

Abstract An efficient alternative method to detect the presence of H5N1 virus based on surface plasmon resonance (SPR) and monoclonal antibody against Influenza A (H5N1) virus was proposed in this study. Samples of H5N1 influenza virus were tested and analyzed. The results showed: 1) The good performance of SPR biosensor was based on the direct detection, real time record, and without any additional labeling. 2) The detection limit of the assay was found to be $10^{4.44}$ TCID₅₀/mL, which was lower than the limit of ELISA of $10^{3.24}$ TCID₅₀/mL. 3) The consumption of antibody in SPR test was 100-fold lower than that in ELISA test. Thus, in the future, with the development of high quality virus antigen and antibody production, the SPR biosensor system would become the most commonly applied and efficient approach for influenza A viruses diagnosis.

Keywords H5N1 virus; surface plasmon resonance; biosensor; rapid detection

1918 年西班牙流感、1957 年亚洲流感、1968 年香港流感和 2009 年猪流感等由流感病毒引起的疫情曾经给人类健康和社会发展造成了巨大损害^[1]。多年来,针对流感病毒的研究多聚焦在分子机制等基础研究。然而,针对流感病毒建立快速和灵敏的检测方法同等重要。H5N1 和 H1N1 是甲型流感病

毒的两个亚型,可在宿主间传播扩散^[2]。针对这种人兽共患病毒,建立快速、灵敏的检测方法显得尤为重要。ELISA 和 RT-PCR 技术是检测流感病毒最常见的两种传统方法,也是检测流感病毒的金标准^[3-5]。但是它们都无法实现快速、实时和无需标记的病毒检测要求。表面等离子共振(Surface

收稿日期:2018-01-22

基金项目:国家重点研发计划重点专项(2016YFD0501001);国家重点研发计划重点专项(2016YFC120600)

第一作者:王中一,博士研究生,E-mail:1589437388@qq.com

通讯作者:陆兵,研究员,主要从事生物安全战略与技术方面研究,E-mail:13693506666@163.com

钱军,研究员,主要从事空气微生物与生物安全方面研究,E-mail:qianj1970@126.com

plasmon resonance, SPR) 生物传感器已经被广泛应用于蛋白相互作用和病原检测等多个研究领域。这类生物传感器可实现直接、快速和无需标记的检测流程^[6], 也可以被应用到流感病毒的快速检测中^[7]。

SPR 生物传感器已然成为研究生物分子间相互作用的首选方法。近年来, SPR 生物传感器在环境监测、病原诊断和食品安全等方面应用广泛^[8]。研究人员最开始, 是将 SPR 技术应用到免疫学分析方面, 例如, 通过检测不同株单克隆抗体与抗原结合的亲和力, 进而确定抗原决定簇的位置^[9]。由于 SPR 技术极大缩短了亲和力检测所需时间, 因此该方法还被广泛应用到疫苗筛选与设计的相关研究中^[10]。而后, 由于 SPR 操作简单和无需标记等优点, 其在医学诊断领域的应用逐渐被推广^[11]。利用 SPR 生物传感器研究分子间相互作用, 需要将检测物特异性抗体偶联到传感器芯片表面, 一般分为如下几步: 偶联 pH 筛选、抗体偶联、亲和力常数测定及结合力分析等过程。在进行相关检测之前, 需要筛选适用于检测物的抗体^[12-13]。抗体质量、检测物所处缓冲环境是决定检测结果最重要的两个因素。该研究利用表面等离子共振(Surface Plasmon Resonance, SPR)生物传感器建立了快速检测 H5N1 流感病毒的新方法, 并且从检测方法的简便性、灵敏度和特异性等方面对该方法进行评价。

利用 SPR 生物传感器检测 H5N1 流感病毒的相关研究鲜有报道。本研究利用 SPR 生物传感器以及 H5N1 单克隆抗体, 对 H5N1 流感病毒样品进行检测分析, 旨在为生物传感器快速检测流感病毒的研究提供技术支撑, 也为其他种类病毒的快速检测提供了新手段。

1 材料与方法

1.1 试验材料

Biacore 3000 生物传感器 (Biacore AB, Uppsala, Sweden), CM5 芯片 (Biacore AB, Uppsala, Sweden), HBS-EP 缓冲液 (pH 7.4), 氨基偶联试剂盒 (Biacore AB, Uppsala, Sweden), H5N1 抗体 (Santa Cruz Biotechnology), 山羊抗鼠 IgG-HRP (Abmart, Inc), TMB 底物 (Solarbio Beijing, Inc)。H1N1 和 H5N1 流感病毒 (实验室保存), 病毒滴度分别为 $10^{7.75}$ TCID₅₀/mL 和 $10^{7.25}$

TCID₅₀/mL, 该研究检测样品为尿囊液。

1.2 最佳偶联 pH 的筛选

利用偶联试剂盒对抗体最佳偶联条件进行筛选。利用 pH 分别为 4.0、4.5、5.0 和 5.5 的 10 mmol/L 乙酸钠溶液将 H5N1 抗体稀释至 10 μg/mL。筛选过程利用 Biacore 3000 自选程序, 所需抗体样品量为 60 μL, 流速 10 μL/min。每次分析结束后用 25 μL 的 50 mmol/L NaOH 清洗芯片。

1.3 抗体偶联

利用偶联试剂盒和 Biacore 3000 自动化程序将抗体偶联在芯片表面。芯片 F2 通道偶联特异性抗体, F1 通道为空白参照。偶联过程中抗体样品浓度为 10 μg/mL, 偶联缓冲液为 pH 5.0 的 10 mmol/L 乙酸钠溶液, 偶联目标为 8 000 pg/mm² (RU), RU 用来描述由于生物分子间的结合引起的生物传感器表面质量的增加量, 1 RU = 1 pg/mm²。

1.4 亲和动力学分析

利用 HBS-EP 缓冲液将病毒样品按照 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 的比例稀释, 利用亲和动力学分析程序进行分析。每次检测流程后, 利用 10 mmol/L glycine-HCl (pH 2.5) 对芯片进行再生 (20 μL/min, 30 s)。整个过程温度为 25 °C。利用 BIAevaluation Software 4.1 对结合常数 (K_a)、解离常数 (K_d) 和亲和力平衡常数 (K_A) 进行分析。

1.5 结合力分析

利用 pH 7.4 的 HBS-EP buffer, 将病毒样品按照 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1 280, 1:2 560, 1:5 120, 1:10 240 的比例稀释。之后利用结合力分析程序进行检测。每次分析后, 利用 10 mmol/L pH 2.5 的 glycine-HCl 20 μL/min, 30 s 对芯片进行再生, 整个过程温度为 25 °C。

1.6 ELISA 分析

利用标准 ELISA 方法对 H5N1 和 H1N1 进行分析。首先, 将病毒样品按照体积比 1:1, 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1 280, 1:2 560, 1:5 120, 1:10 240, 1:20 480, 1:40 960, 1:81 920, 1:163 840, 1:327 680, 1:655 360, 1:1 310 720, 1:2 621 440 的比例稀释, 之后将稀释后的病毒样品包被至 96 孔板, 140 μL/孔。一抗为 H5N1 特异性抗体, 二抗为山羊抗鼠 IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology)。

2 结果与分析

2.1 检测芯片的制备

为获得检测 H5N1 流感病毒的芯片,将特异抗体偶联到芯片表面。经过初步检测,发现在 pH 4.5 的缓冲条件下抗体富集量最大,反应值达到 23 000 1 pg/mm² (RU)。但是,在 pH 5.0 的缓冲条件下可以达到 8 000 pg/mm² (RU) 的目标值(图 1)。为能够在较为温和的缓冲条件下进行抗体偶联,最终选择的最佳偶联条件为 pH 5.0 的 10 mmol/L 乙酸钠溶液。经过偶联后,成功将 8 000 pg/mm² (RU) 的抗体偶联到芯片表面,用于后续检测分析(图 2)。

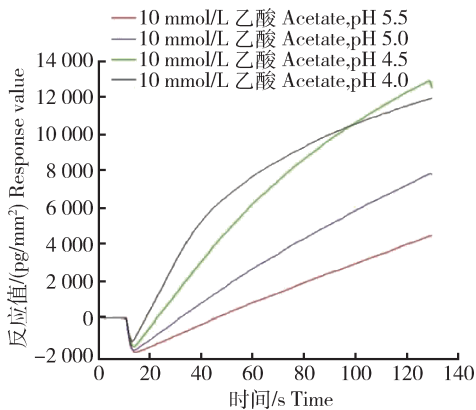


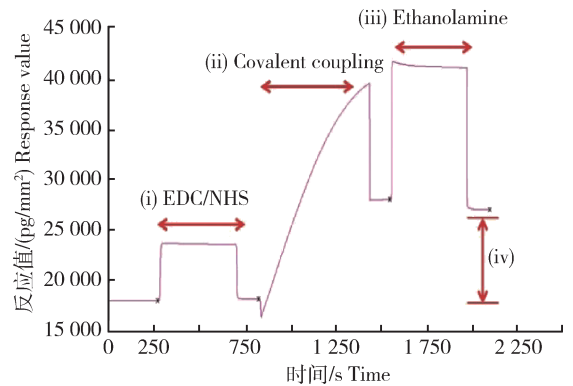
图 1 在 CM5 芯片表面偶联 H5N1 特异性抗体的最佳条件筛选

Fig. 1 pH optimization for H5N1 antibody immobilization on a CM5 sensor chip

2.2 抗体亲和动力学分析与结合力分析

利用 SPR 生物传感器进行病毒与抗体的亲和动力学分析。结果显示,偶联到芯片表面的抗体可特异性地与 H5N1 病毒结合(图 3)。当流动相为 H1N1 病毒时,反应信号弱。并且,可以通过计算机得出的 RU 值变化,实时观察整个结合和解离过程。利用 1:1 Langmuir model 计算出 H5N1 病毒与 H5N1 单克隆抗体的亲和力常数(表 1)。结果显示,H5N1 与抗体的亲和力平衡常数(K_A)为 1.9×10^8 L/mol,优于 H1N1 的 K_A 值 1.3×10^7 L/mol。在结合力分析结果中,可以发现当稀释度达 1:640 时,H5N1 信号值为 0.57 ± 0.03 pg/mm²。当稀释度 < 640 时,可区分 H5N1 样品和 H1N1 样品(图 4)。经过计算,检测限 = 病毒液原始浓度/可检测稀释倍数 = $10^{7.25} / 640$ TCID₅₀/mL = $10^{4.44}$ TCID₅₀/mL,SPR

技术的检测限为 $10^{4.44}$ TCID₅₀/mL,低于 ELISA 方法的 $10^{3.24}$ TCID₅₀/mL。



(i) 利用 NHS 和 EDC 激活芯片表面;(ii) 抗体偶联;(iii) 乙醇胺封闭;(iv) 计算获得偶联量(8 000 pg/mm² (RU))。图中“x”为加样时间点。

(i) Activation by NHS and EDC; (ii) Immobilization of antibodies; (iii) Blocked by injecting ethanolamine; (iv) Response of antibodies immobilized on the chip (about 8 000 pg/mm² (RU)). x means the time point of sample injection.

图 2 H5N1 抗体偶联过程

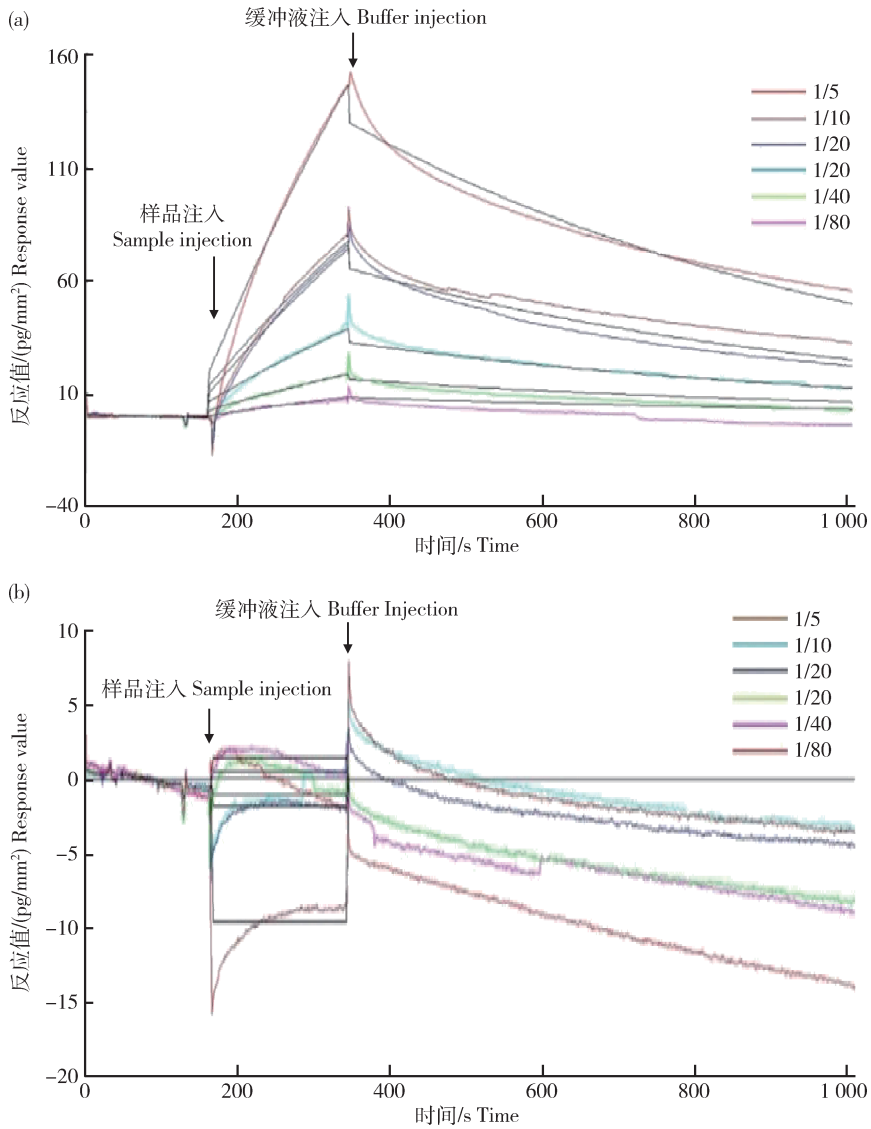
Fig. 2 Sensorgrams showing the immobilization of H5N1 antibody on the CM5 sensor chip surface

2.3 ELISA 分析

利用相同的 H5N1 流感病毒单克隆抗体,结合标准 ELISA 方法,进行 H1N1 病毒的检测。检测结果表明,当稀释度达到 1:10 240 时,在 450 nm 处的吸光值达到 0.419 ± 0.010 。当稀释度 < 10 240 时可区分 H5N1 样品与 H1N1 样品(图 5)。

3 讨论

本研究成功建立一种基于 SPR 生物传感器的快速检测甲型流感病毒的检测方法。并且将这种方法与传统的 ELISA 方法进行比较,分析其优缺点(表 2)。对 SPR 方法而言,可以在无需标记的前提下,利用抗原与抗体的直接相互作用,结合表面等离子共振技术获得病原与芯片表面抗体的结合动力学常数(K_A 和 K_d)。尽管 SPR 生物传感器的检测限要低于 ELISA 方法,但是在抗体消耗和时间成本等环节要明显优于 ELISA 方法。此外,可以实时观察抗原与抗体的结合过程,并且芯片具有在连续一周的工作时间内有较强的稳定性和重复性^[14]。除了抗体消耗和时间成本,检测方法的复杂性也是必须要考虑的。在一些高通量检测过程中,简单快速的方法往往更加适用。而在这方面,SPR 技术要明显优



其中 1/5, 1/10, 1/20, 1/30, 1/40 和 1/80 为稀释倍数。

1/5, 1/10, 1/20, 1/30, 1/40 and 1/80 are different dilution values.

图 3 H5N1(a)、H1N1(b) 流感病毒与 H5N1 单克隆抗体的亲和和动力学分析

Fig. 3 Kinetics of the association and dissociation of H5N1 antibody with H5N1 sample (a) and H1N1 sample (b)

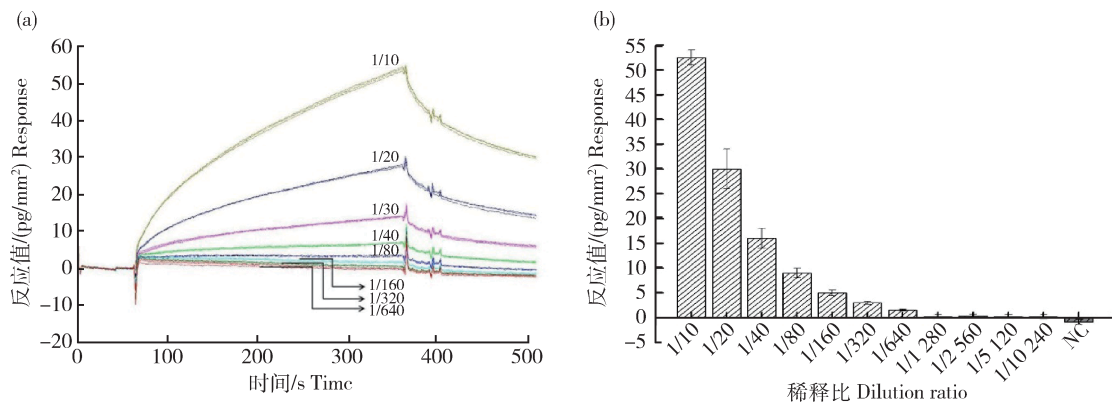
表 1 H5N1、H1N1 流感病毒与 H5N1 单克隆抗体的亲和和动力学分析

Table 1 Kinetics of the association and dissociation of H5N1 antibody with H5N1 sample and H1N1 sample

分析样品 Analyze sample	$K_a / (\text{mol/L})^{-1}$	K_d / s^{-1}	$K_A / (\text{mol/L})^{-1}$
H5N1	2.6×10^5	1.4×10^{-3}	1.9×10^8
H1N1	1.3×10^2	1.0×10^{-5}	1.3×10^7

注: 1:1 Langmuir-binding 模型用来测定动力学平衡常数。 K_a , 结合常数, K_d , 分离常数, K_A , 亲和力平衡常数。

Note: 1:1 Langmuir-binding model was used to determine the kinetic and equilibrium constants. K_a , association constant; K_d , dissociation rate constants, K_A , equilibrium association constant.



其中 1/10, 1/20, 1/30, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280, 1/2560, 1/5120, 1/10240 为稀释倍数, NC 为对照。
1/10, 1/20, 1/30, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280, 1/2560, 1/5120 and 1/10240 are different dilution values and NC is control.

图 4 H5N1 与芯片表面 H5N1 抗体结合力分析曲线 (a) 和不同稀释度检测值 (b) 分析

Fig. 4 Binding analysis of H5N1 samples with the H5N1 antibody immobilized on the CM5 sensor chip surface including binding analysis curve (a) and detection of different dilution values (b)

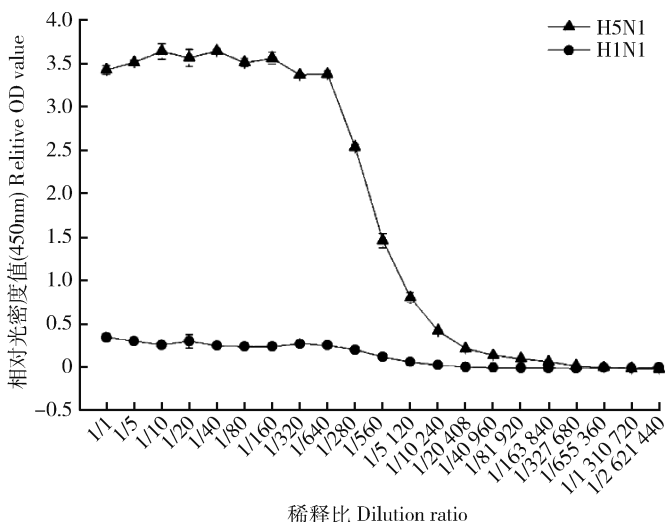


图 5 ELISA 检测 H5N1 和 H1N1 病毒样品

Fig. 5 ELISA analysis of H5N1 samples and H1N1 samples

表 2 SPR 与 ELISA 方法的比较

Table 2 The comparison between SPR and ELISA

分析方法 Method	H5N1 抗体使用量/ μg Consumption of H5N1 antibody	样品使用量/ μL Volume of sample	检测限/(TCID ₅₀ /mL) Detection limit	检测时间/h Detection time
SPR	0.001 5	140	$10^{4.44}$	0.3
ELISA	0.2	140	$10^{3.24}$	24

注: H5N1 检测样品为 140 μL 。H5N1 单克隆抗体在芯片上的偶联量为 8 000 RU, 而 1 RU 对应 1 pg/mm^2 。CM5 芯片面积为 0.75 mm^2 , 所以抗体消耗量为 0.001 5 μg ($8\ 000\ \text{pg}/\text{mm}^2 \times 0.75\ \text{mm}^2 \div 4$)。

Note: The volume of detected H5N1 sample is 140 μL . The H5N1 antibody was immobilized onto the chip to obtain 8 000 resonance units (RU) and 1 RU equals 1 pg of bound protein/ mm^2 of sensor surface. The area of the CM5 chip is 0.75 mm^2 . So the consumption of antibody for each reaction is 0.001 5 (Consumption of antibody = $8\ 000\ \text{pg}/\text{mm}^2 \times 0.75\ \text{mm}^2 \div 4$).

于 ELISA 技术。SPR 技术可实现仪器自动化检测, 全程无需技术人员看守。

但是也存在一些问题, 例如基于抗原抗体结合特性检测病原的 SPR 生物传感器技术, 极大地受限于抗体的质量, 包括抗体特异性和稳定性等。并且单克隆抗体的制备需要耗费大量的人力和物力, 这也增加了该技术应用到多种病原检测的难度。近年来, 研究者逐渐将核酸适配体与 SPR 技术结合, 用于检测流感病毒等重要病原微生物^[15-16]。该技术在检测成本上要更加低廉, 今后有望在病原体检测方面发挥重要作用^[17]。

综上所述, 该研究成功建立一种基于 SPR 生物传感器的快速检测 H5N1 流感病毒的新方法。该方法不仅具有直接、快速和实时检测的特点, 而且整个过程无需任何标记。但在抗体相同的情况下, SPR 在检测限方面要略低于传统的 ELISA 方法, SPR 检测限为 $10^{4.44}$ TCID₅₀/mL, ELISA 检测限为 $10^{3.24}$ TCID₅₀/mL。在抗体消耗量方面, SPR 技术要优于 ELISA 技术近 100 倍。该研究为流感病毒的快速检测提供了备选方案, 并为其他病原的检测研究提供了新的思路。

参考文献 References

[1] Taubenberger J K, Morens D M. Pandemic influenza-including a risk assessment of H₅N₁[J]. *Revue Scientifique Et Technique*, 2009, 28(1): 187-202

[2] Dunning J, Baillie J K, Cao B, Hayden F G. Antiviral combinations for severe influenza[J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2014, 14(12): 1259-1270

[3] Dhumpa R, Handberg K J, Jorgensen P H, Yi S, Wolff A, Bang D D. Rapid detection of avian influenza virus in chicken fecal samples by immunomagnetic capture reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay[J]. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2011, 69(3): 258-265

[4] Kolosova A Y, Shim W B, Yang Z Y, Eremin S A, Chung D H. Direct competitive ELISA based on a monoclonal antibody for detection of aflatoxin B₁ Stabilization of ELISA kit components and application to grain samples[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2006, 384(1): 286-294

[5] Chen Y W, Luo W X, Song H J, Yin B Y, Tang J X, Chen Y X, Ng M H, Yeo A E T, Zhang J, Xia N S. Mimotope ELISA for detection of broad spectrum antibody against avian H₅N₁ influenza virus[J]. *PLoS One*, (2011-06-09): e24144 DOI: 10.1371/journal.pone.0024144

[6] Myszka D G, Rich R L. Implementing surface plasmon resonance biosensors in drug discovery[J]. *Pharmaceutical*

Science and Technology Today, 2000, 3(9): 310-317

[7] Wong C L, Chua M, Mittman H, Choo L X, Lim H Q, Olivo M. A Phase-intensity surface plasmon resonance biosensor for avian influenza A (H₅N₁) detection[J]. *Sensors*, 2017, 17(10), 2363 DOI: 10.3390/s17102363

[8] Pennacchio A, Varriale A, Esposito M G, Scala A, Marzullo V M, Staiano M, D'auria S. A rapid and sensitive assay for the detection of benzylpenicillin (PenG) in Milk[J]. *PLoS One*, (2015-07-13) DOI: 10.1371/journal.pone.0132396

[9] Luo C, Luo H B, Zheng S X, Gui C S, Yue L D, Yu C Y, Sun T, He P L, Chen J, Shen J H, Luo X M, Li Y X, Liu H, Bai D L, Shen J K, Yang Y M, Li F Q, Zuo J P, Hilgenfeld R, Pei G, Chen K X, Shen X, Jiang H L. Nucleocapsid protein of SARS coronavirus tightly binds to human cyclophilin A[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 321(3): 557-565

[10] Hearty S, Conroy P J, Ayyar B V, Byrne B, O'Kennedy R. Surface plasmon resonance for vaccine design and efficacy studies: Recent applications and future trends[J]. *Expert Review of Vaccines*, 2010, 9(6): 645-664

[11] Vaisocherová H, Faca V M, Taylor A D, Hanash S Y, Jiang S. Comparative study of SPR and ELISA methods based on analysis of CD166/ALCAM levels in cancer and control human sera[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, 24(7): 2143-2148

[12] Saksono B, Dewi B E, Nainggolan L, Suda Y S. A highly sensitive diagnostic system for detecting dengue viruses using the interaction between a sulfated sugar chain and a virion[J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0123981 DOI: 10.1371/journal.pone.0123981

[13] Hu J D, Wang T T, Wang S, Chen M W, Wang M P, Mu L Y, Chen H Y, Hu X R, Liang H, Zhu J H, Jiang M. Development of a surface plasmon resonance biosensing approach for the rapid detection of porcine circovirus type2 in sample solutions [J]. *PLoS One*, (2014-10-29) DOI: 10.1371/journal.pone.0111292

[14] Ashley J, D' aurelio R, Piekarska M, Temblay J, Pleasants M, Trinh L, Rodgers T, Tothill I. Development of a beta-Lactoglobulin sensor based on SPR for milk allergens detection[J]. *Biosensors*, 2018, 8(2), 32 DOI: 10.3390/bios8020032

[15] Li Y B, Wang R H. *Aptasensors for Detection of Avian Influenza Virus H₅N₁* [M]. In: Li Y B, Wang R H. eds *Biosensors and Biodetection*. New York, NY: Springer New York, 2017

[16] Nguyen V T, Seo H B, Kim B C, Kim S K, Song C S, Gu M B. Highly sensitive sandwich-type SPR based detection of whole H₅Nx viruses using a pair of aptamers[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, 86: 293-300

[17] Kang K N, Lee Y S. *RNA Aptamers: A Review of Recent Trends and Applications* [M]. In: Kang K N, Lee Y S. eds. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012