

• 论 著 •

无标记检测 CD4⁺T 淋巴细胞的免疫传感器构建*

蒋兴宇, 蒋栋能, 孟凡飞, 蒲晓允

(第三军医大学新桥医院检验科, 重庆 400037)

摘要:目的 构建一种无标记检测 CD4⁺T 淋巴细胞的免疫传感器。方法 采用葡萄球菌 A 蛋白(SPA)法定向固定单克隆抗体于金叉指微阵列电极表面以捕获 CD4⁺T 淋巴细胞,并用循环伏安法(CV)扫描对金叉指微阵列电极表面的修饰情况进行表征,最后通过电化学交流阻抗谱法(EIS)对免疫传感器捕获的 CD4⁺T 淋巴细胞进行阻抗检测,通过等效电路拟合获得的阻抗值变化绘制标准曲线。结果 该免疫传感器检测 CD4⁺T 淋巴细胞的线性范围是(5.0×10³—5.0×10⁶)/mL,检测下限为 5.0×10²/mL。结论 该免疫传感器的结果准确可靠,检测过程简便,价格低廉,有望用于实时检测系统,为实现快速、准确、价廉的 CD4⁺T 淋巴细胞分类计数提供帮助。

关键词:叉指微阵列电极; 免疫传感器; 葡萄球菌 A 蛋白; 交流阻抗谱

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.06.012

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)06-0753-04

Immunosensor construction of label free detection of CD4⁺T lymphocytes*JIANG Xingyu, JIANG Dongneng, MENG Fanfei, PU Xiaoyun^a

(Department of Clinical Laboratory, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract:Objective To construct an immunosensor for detecting CD4⁺T lymphocytes without labeling. **Methods** The staphylococcus protein A(SPA) method was adopted to conduct the oriented immobilization of CD4 monoclonal antibodies on the gold interdigitated microelectrode surface for capturing CD4⁺T lymphocytes. Then cyclic voltammetry(CV) method was used to conduct the representation of modification situation on the gold interdigitated microelectrode surface. Finally the electrochemical impedance spectroscopy(EIS) was used to detect the impedance of CD4⁺T lymphocytes captured by the immunosensor. The standard curve was drawn by the impedance values change obtained by the equivalent electric circuit fitting. **Results** The linear range of this immunosensor for detecting CD4⁺T lymphocytes was (5×10³—5.0×10⁶)/mL, with lower detection limit of 5.0×10²/mL. **Conclusion** The constructed immunosensor has accurate and reliable detection results which is simple to operate accurately, convenient and cheap, which might be expected to be used in the real-time detection system, and offers help for realizing rapid, accurate and inexpensive CD4⁺T lymphocyte count.

Key words: interdigitated microelectrode; immunosensor; staphylococcal protein A; alternating current impedance spectrum

CD4⁺T 淋巴细胞(如 Th 细胞)是一种重要的免疫细胞,它们通过细胞间相互作用和细胞因子来调节免疫细胞的募集和增殖^[1],其产生的细胞因子类型与量的改变与免疫缺陷病,自身免疫疾病以及机体过敏的发生相关^[2]。此外,感染 HIV 病毒后,机体 CD4⁺T 淋巴细胞的缺失会导致获得性免疫缺乏综合征(AIDS)^[3]。目前,CD4⁺T 淋巴细胞的检测方法包括:流式细胞计数、免疫微珠分选技术等,但这些方法均存在仪器及配套试剂昂贵,需要通过专业培训的人员操作等缺陷,CD4⁺T 淋巴细胞计数还无法在基层医院广泛应用,因此亟待建立一种更简便、价廉、快速的新型检测方法。本研究采用金叉指微阵列电极(IDAM)为工作电极固定单克隆抗体以捕获 CD4⁺T 淋巴细胞,以电化学交流阻抗谱法为检测方法,为 CD4⁺T 淋巴细胞计数提供了一种灵敏、简便、快捷、价廉的方法。

1 材料与方

1.1 仪器与试剂 CHI660D 型电化学工作站(上海辰华仪器公司),pH-15-P11 型酸度计(北京捷伦公司),XE-2100 型全自

动血液分析仪(Sysmex 公司),IDAM(苏州长三角生物公司),单克隆鼠抗人 CD4 抗体购自美国 Pierce 公司;葡萄球菌 A 蛋白(SPA)购自中国上海生工;牛血清白蛋白(BSA)购自中国 biosharp 公司;PBS 缓冲液,1.2 mol/L 的 NaOH 溶液,1.2 mol/L 的 HCl 溶液,10.0 mmol/L[Fe(CN)₆]^{3-/4-}的 1.0 mol/L KCl 混合液自行配置。其余化学试剂均为分析纯;所有水溶液的配制均使用超纯水(Milli-Q 型纯水机,Millipore 公司)。

1.2 免疫传感器的制备

1.2.1 IDAM 的预处理 将 IDAM 用 Piranha 液(30% H₂O₂:浓 H₂SO₄ 体积比 1:3)浸泡清洗 10 min 后,超纯水反复清洗,再分别用 1.2 mol/L 的 NaOH 和 1.2 mol/L 的 HCl 浸泡清洗 10 min,超纯水及 95%乙醇清洗后,氮气吹干备用。

1.2.2 电极表面 SPA 膜自组装 将 SPA 溶液 5 μL(5 mg/mL)均匀涂布于电极表面,并置于 4 ℃,过夜自组装。将 SPA 自组装完成的电极分别用 PBS 缓冲液(pH 值 7.2,0.1 mmol/L)和超纯水反复冲洗,氮气吹干备用。

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81472034)。

作者简介:蒋兴宇,男,硕士研究生在读,主要从事医学现场快速检验关键技术的研究。△ 通信作者,E-mail:158093200@qq.com。

1.2.3 单克隆鼠抗人 CD4 抗体的固定 将 10 μ L 单克隆鼠抗人 CD4 抗体均匀涂布于已组装 SPA 膜的电极表面, 室温反应 2 h 后, 用 PBS 缓冲液反复冲洗后, 再用 1% 的 BSA 溶液封闭电极表面未结合的活性位点, 室温反应 1 h。封闭后的电极用 PBS 缓冲液和超纯水反复冲洗, 氮气吹干, 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

1.3 细胞准备

1.3.1 细胞培养 将人 T 淋巴细胞白血病细胞株 Molt-3 细胞(CD4⁺T 淋巴细胞株)与人淋巴瘤细胞株 Daudi 细胞(B 淋巴细胞株)分别置于含 10% 小牛血清、青霉素(100 U/mL)、链霉素(100 μ g/mL)的 PRMI1640 培养液的培养瓶中, 于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 的培养箱中体外培养。在对数生长期, 用胰酶消化细胞, 调节最终细胞浓度为 5.0 \times 10⁶ /mL, 不同浓度的细胞悬液通过该浓度的细胞稀释获得, 细胞计数在 XE-2100 全自动血液分析仪上完成。

1.3.2 样本前处理 取 3 mL EDTA-K₂ 抗凝全血以 1 : 3 比例加入红细胞裂解液, 涡旋混匀; 4 $^{\circ}$ C 放置 15 min 后涡旋混匀, 450 \times g 离心 10 min, 弃去上清; 加入 2 mL 红细胞裂解液, 涡旋混匀后 4 $^{\circ}$ C, 450 \times g 离心 10 min 沉淀白细胞, 彻底弃去上清液; 加入 PBS(pH 值 7.4) 1 mL 重悬细胞后待用。

1.4 免疫传感器电化学检测及性能评估

1.4.1 细胞捕获及电化学检测 取 10 μ L 的细胞悬液滴加在修饰传感器表面, 并在 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 1 h, 以此来捕获细胞。传感器在细胞捕获后用 0.01 mmol/L pH 7.4 PBS 清洗 3 次后立即浸入含有 10.0 mmol/L [Fe(CN)₆]^{3-/4-} 的氧化还原探针的溶液中, 测定其法拉第阻抗值。

1.4.2 免疫传感器对细胞浓度的线性响应及检出限的确定 将 Molt-3 细胞悬液进行倍比稀释, 以 10.0 mmol/L [Fe(CN)₆]^{3-/4-} 为氧化还原探针, 利用传感器对不同的浓度的细胞悬液进行交流阻抗检测。

1.4.3 特异性试验 将 Molt-3 细胞悬液, Daudi 细胞悬液和 PBS 空白液进行传感器的特异性试验, 细胞悬液浓度均为 1.0 \times 10⁴ /mL。按照上述电化学方法进行检测, 并进行比对。

1.4.4 储存稳定性 在优化试验条件下, 将传感器置于 37 $^{\circ}$ C 无菌密闭湿润容器内, 放置 30 d, 每隔 3 d 对电极进行测试, 并记录还原峰电流响应。

1.4.5 临床标本检测 收集 30 份临床病患新鲜 EDTA-K₂ 抗凝全血, 样品处理方法同 1.3.2。采用免疫传感器法和流式法进行检测并计算 CD4⁺T 淋巴细胞的绝对值(个/微升), 并比对检测结果。

1.5 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计学软件进行数据分析。计量的组件间比较采用 t 检验, P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 免疫传感器的分析原理 免疫传感器的制备及检测原理如图 1 所示, 在交流阻抗测试中, 传感器表面的修饰层会影响氧化还原探针的电子传递, 使其不易穿过修饰层而接触到传感器表面, 从而引起界面电化学阻抗的显著变化^[4]。而细胞膜具有绝缘性, 当细胞通过抗体捕获而结合到电极表面时, 会形成一道阻止氧化还原探针接近电极表面的屏障^[5], 引起电子传递阻抗 R_{ct} 的增加, 且 R_{ct} 与电极表面修饰层及细胞的浓度

相关。

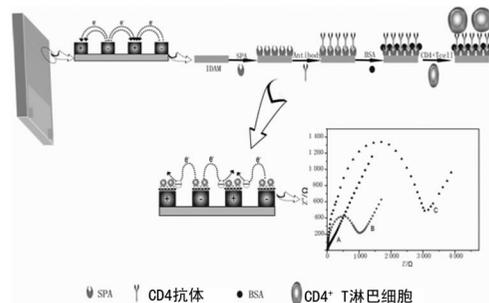


图 1 免疫传感器的制备及检测原理

2.2 免疫传感器修饰过程的电化学表征 电化学检测系统均采用三电极体系, 在含有 10.0 mmol/L [Fe(CN)₆]^{3-/4-} 的氧化还原探针的溶液中进行。裸金叉指微阵列电极 (bare IDAM), SPA 自组装 IDAM (SPA/IDAM), 单克隆抗体固定于 IDAM 表面 (SPA/Ab/IDAM), 捕获 CD4⁺T 淋巴细胞 (Cell/SPA/Ab/IDAM) 的电化学行为, 如图 2、3 所示。图 2 为修饰过程的 CV 图, 从图中可见, 随着 SPA 膜自组装, SPA 膜结合单克隆抗体在传感器表面而形成了生物识别膜, 电子传递受阻, 从而导致峰电流降低。图 3 为修饰过程的 Nyquist 图, 从图中可见, 传感器表面的修饰层会影响氧化还原探针的电子传递, 使电子传递阻抗 R_{ct} 增加, 而细胞膜具有绝缘性, 当 CD4⁺T 细胞被捕获后, 同样引起 R_{ct} 增加。

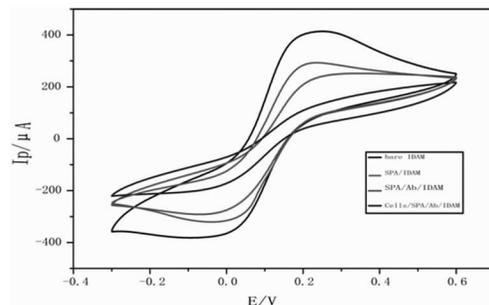


图 2 传感器修饰的 CV 表征

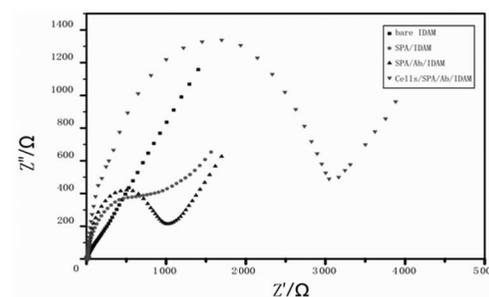
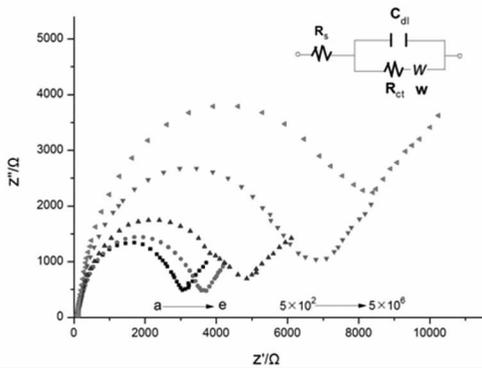


图 3 传感器修饰的交流阻抗表征

2.3 免疫传感器与细胞浓度的线性响应关系及检测限 在最优条件下, 通过检测免疫传感器在不同细胞浓度下测量的交流阻抗变化情况。图 4 为免疫传感器结合不同浓度 Molt-3 细胞后的 Nyquist 图, 如图所示, 电子传递阻抗 R_{ct} 值随着结合 Molt-3 细胞浓度的增加而增大。图 5 为 Δ R_{ct} 值与细胞浓度之间的关系曲线, Δ R_{ct} 为免疫传感器在结合细胞前后 R_{ct} 的差值。结果表明, R_{ct} 值与 Molt-3 细胞浓度的对数在 5.0 \times 10³ /mL - 5.0 \times 10⁶ /mL 呈线性关系, 线性方程为 Δ R_{ct} = -774 + 391 \times

$\lg N_{\text{细胞}}, N_{\text{细胞}}$ 的单位是个/毫升,线性相关系数为:0.988,检测下限为: $5.0 \times 10^2 / \text{mL}$ 。



注: R_s 代表电解质溶液电阻; C_{dl} 代表界面区间电荷产生的双电层电容; W 代表离子从本体溶液向电极表面扩散导致的 Warburg 阻抗; R_{ct} 代表界面发生的氧化还原反应时产生的电子转移阻抗。

图 4 不同细胞浓度的 Nyquist 图

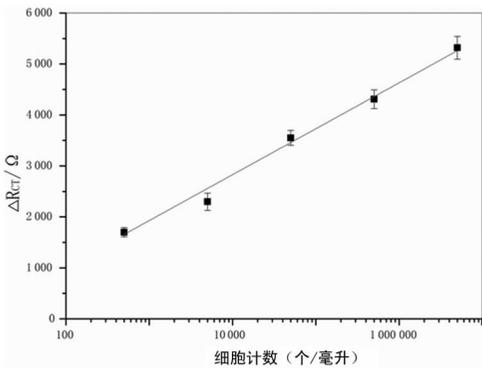


图 5 免疫传感器检测 $CD4^+$ T 淋巴细胞的标准曲线

2.4 特异性试验 试验中对 Molt-3 细胞、Daudi 细胞两种细胞进行交流阻抗检测,并以 PBS 缓冲液为阴性对照。结果显示,该免疫传感器对 Molt-3 细胞进行交流阻抗检测所得的 R_{ct} 值大于 Daudi 细胞和 PBS 缓冲液所得值,如图 4 所示,表明该免疫传感器对 $CD4^+$ T 细胞具有较好的特异性。

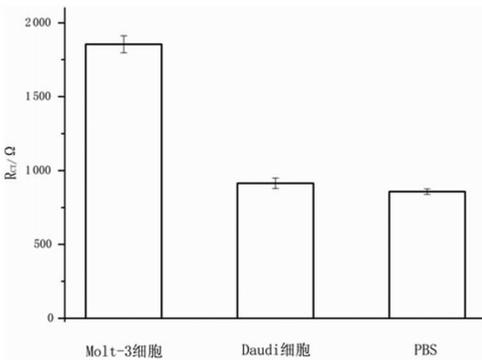


图 6 免疫传感器的特异性

2.5 稳定性 为确定免疫传感器的稳定性,将修饰好的传感器置于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 无菌密闭湿润容器内,放置 30 d,每隔 3 d 对电极进行测试,并记录还原峰电流响应,在放置 30 d 后,该传感器的响应信号为初始信号的 95.51%,表明其具有良好的稳定性。

2.6 临床样品的准确性 将免疫传感器检测所得的 $CD4^+$ T 淋巴细胞绝对值与流式细胞术的检测结果进行统计学分析。

两种方法检测 $CD4^+$ T 淋巴细胞平均值、标准差以及中位数的统计见表 1。经 t 检验,免疫传感器法与流式细胞术检测的 $CD4^+$ T 淋巴细胞数差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 两种方法检测 $CD4^+$ T 淋巴细胞(个/微升)的结果比较

项目	免疫传感器法	流式法
平均值	2 260	2 338
标准差	403	369
中位数	1 904	1 815
最小值	132	108
最大值	4 879	5 718

3 讨论

免疫传感器基于免疫测定技术与生物传感技术相结合,融合两者优点,具有高特异性、高灵敏度、操作简便快速等特点,在临床检验方面具有广阔的应用前景^[6]。本文将 IDAM 作为工作电极,通过单克隆抗体自组装生物功能化该工作电极界面,成功构建了用于检测 $CD4^+$ T 淋巴细胞计数分析的免疫传感器,具有一定的科学意义和较好的应用前景。本研究的优点在于:(1)采用的 IDAM 包含了一对微带电极阵列,每个阵列由多个宽度和间距为微米级的指电极并联组合而成,较传统电极具有更高灵敏度,更短检测时间,信噪比更高等特点^[7]。(2)采用 SPA 法定向固定单克隆抗体,SPA 是金黄色葡萄球菌细胞壁中的一种多肽(相对分子量为 42 000),其与 Au 亲和常数高达 10^8 mol/L ,进而可在传感器 Au 膜表面形成稳定均一的单分子膜层^[8],且蛋白 A 具有与抗体的 Fc 段结合的特性,而抗原与抗体的结合位点在抗体的 Fab 段,故蛋白 A 与抗体结合后不影响抗体与抗原的结合,且修饰层稳定,操作简单,无须中间物(如交联剂)引入^[9],具有很好的重现性及稳定性^[10]。(3)免疫传感器可分为无标记(直接测定)型和标记(间接测定)型两种类型^[11],以电化学交流阻抗谱法为检测方法,实现了无标记的 $CD4^+$ T 淋巴细胞计数分析,较标记型免疫传感器极大地简化制备和操作过程。交流阻抗谱的变化可反映电极因固定生物分子或发生生物学反应而引起的电容和电子传递电阻等电化学性质的变化。由于细胞特殊的介电行为,修饰电极表面识别的细胞在数量、生长状况或形态上的变化都会影响电极的界面性质^[12]。因此,利用电化学交流阻抗谱可有效的检测细胞与修饰电极表面配体分子的特异性的识别反应。

本免疫传感器用于检测 $CD4^+$ T 淋巴细胞检测线性范围为 $(5.0 \times 10^3 \sim 5.0 \times 10^6) / \text{mL}$,检测下限为 $5.0 \times 10^2 / \text{mL}$,具有较好的灵敏度;与参考方法流式法^[13] 比对,结果无显著性差异,具有较好的特异性;稳定性好($4\text{ }^\circ\text{C}$)放置 30 d 后,该传感器的响应信号为初始信号的 95.51%;无需荧光二抗标记,成本低廉,易于操作,可批量生产。不足之处:固定抗体单一,只能检测一种 T 淋巴亚群细胞;未集成为微流控芯片检测系统,增加了操作的复杂程度。若进一步改进,定会为临床检测 T 淋巴亚群细胞提供足够的便利。

参考文献

[1] Read A, Powell D, Oestreich J. T follicular helper cell programming by cytokine-mediated events(下转第 759 页)

清的 HMGB1 水平高低在不同年龄、性别、疾病类型的患者中分布也有所差异,这也提示 HMGB1 水平可作为预测和反映 ABTI 严重程度的检测指标,值得在临床加以重视。

参考文献

- [1] 夏中平, 闻久辉, 颜海波, 等. 降钙素原在急性胆道系统感染患者围手术期抗感染疗效中的价值[J]. 中华医院感染学杂志, 2015, 25(22): 5149-5151.
- [2] 任超, 李秀花, 许碧磊, 等. 中枢拮抗高迁移率族蛋白 B1 对脓毒症脑损伤的影响[J]. 中华急诊医学杂志, 2016, 25(4): 433-438.
- [3] 童森, 祝筱梅, 吴瑶, 等. 拮抗高迁移率族蛋白 B1 对烫伤小鼠白细胞介素-35 表达及 T 淋巴细胞免疫功能的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2016, 23(1): 11-15.
- [4] 叶敏, 侯长春, 黄荣道, 等. 高迁移率族蛋白 B1 活化 p38MAPK 对人支气管上皮细胞胸腺基质淋巴生成素表达的影响[J]. 广东医学, 2015, 36(8): 1169-1171.
- [5] 许命锋, 邱志辉, 陈忠城. 血清高迁移率族蛋白 B1 水平与急性冠状动脉综合征的相关性研究[J]. 检验医学与临床, 2013, 10(13): 1645-1647.
- [6] 侯园花, 任建功, 罗晖, 等. 糖尿病周围神经病变患者血清脑源性神经营养因子与高迁移率族蛋白 B1 水平相关性的研究[J]. 中国糖尿病杂志, 2014, 22(12): 1064-1067.
- [7] Woolbright BL, Dorko K, Antoine DJ, et al. Bile acid-induced necrosis in primary human hepatocytes and in patients with obstructive cholestasis[J]. Toxicol Appl Phar-

macol, 2015, 283(3): 168-177.

- [8] 胡志刚, 王春新, 陈国千. 地震伤员血清高迁移率族蛋白 B1 水平的变化[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(9): 928-929.
- [9] 于清霞, 夏永宏, 王静, 等. 急性胰腺炎严重程度和预后与降钙素原、C 反应蛋白、高迁移率族蛋白 B1 的关系[J]. 中华实验外科杂志, 2014, 31(9): 2036-2038.
- [10] 张宇, 王刚, 祝文彩, 等. 急性肝衰竭大鼠高迁移率族蛋白 B1 的变化和意义[J]. 世界华人消化杂志, 2015, 23(9): 1402-1410.
- [11] Shen X, Li WQ. High-mobility group box 1 protein and its role in severe acute pancreatitis[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(5): 1424-1435.
- [12] 郭继中, 张婷, 谢震雄, 等. 血清高迁移率族蛋白 B1 在急性化脓性胆管炎发生中的作用及意义研究[J]. 中华消化内镜杂志, 2013, 30(8): 454-457.
- [13] 刘娟. 高迁移率族蛋白 B1 的生物学作用及研究进展[J]. 南昌大学学报(医学版), 2013, 53(3): 89-92.
- [14] 白明辉, 孙君军, 董玉宁, 等. HMGB1 在胆囊癌组织中的表达及意义[J]. 中国现代普通外科进展, 2014, 17(7): 563-564, 569.
- [15] 李玲, 尹苹, 徐克前, 等. 急性胰腺炎患者血浆内皮素及 D-二聚体水平变化研究[J]. 检验医学与临床, 2013, 10(11): 1411-1412.

(收稿日期: 2016-10-14 修回日期: 2017-01-13)

(上接第 755 页)

- [1] [J]. Immunology, 2016, 149(3): 253-261.
- [2] Gujar A, Jenkins K, Guy S, et al. Aberrant lymphocyte activation precedes delayed virus-specific T-cell response after both primary infection and secondary exposure to hepatitis B virus in the woodchuck model of hepatitis B virus infection[J]. J Virol, 2008, 82(14): 6992-7008.
- [3] Veazey S, Marx A, Lackner A. The mucosal immune system: primary target for HIV infection and AIDS[J]. Trends Immunol, 2001, 22(11): 626-633.
- [4] 徐乐慧, 洪鸣凰, 赵文杰, 等. 生物大分子结晶技术研究进展[J]. 中国医药工业杂志, 2011, 42(7): 554-559.
- [5] Lo M, Keese R, Giaever I. Impedance analysis of MDCK cells measured by electric cell-substrate impedance sensing[J]. Biophys J, 1995, 69(6): 2800-2807.
- [6] 贾立永, 郑磊, 王前, 等. 电化学免疫传感器及其在临床检验中的应用进展[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(11): 1329-1330.
- [7] 颜小飞, 汪懋华, 安冬. 基于叉指阵列微电极的阻抗免疫传感器研究进展[J]. 分析化学, 2011, 39(10): 1601-1610.
- [8] 裴仁军, 胡继明, 胡毅, 等. SPA 定向固定抗体的纤维蛋白压电免疫传感器的研究[J]. 高等学校化学学报, 1998, 19

(3): 3363-3661.

- [9] Sun X, Zhu Y, Wang X. Amperometric immunosensor based on a protein A/deposited Gold nanocrystals modified electrode for carbofuran detection[J]. Sensors, 2011, 11(12): 11679-11691.
- [10] Derkus B, Cebesoy Emregul K, Mazi H, et al. Protein A immunosensor for the detection of immunoglobulin G by impedance spectroscopy [J]. Bioprocess Biosyst Eng, 2014, 37(5): 965-976.
- [11] 王珂, 江德臣, 刘宝红, 等. 无标记型免疫传感器的原理及其应用[J]. 分析化学, 2005, 22(3): 411-416.
- [12] Pethig R. Dielectric and electronic properties of biological materials[M]. New York: John Wiley and Sons, 1979: 376.
- [13] Wade D, Daneau G, Aboud S, et al. WHO multicenter evaluation of FACSCOUNT CD4 and pima CD4 T-Cell count systems: instrument performance and misclassification of HIV-infected patients[J]. J Acquir Immune Defic Syndr, 2014, 66(5): 98-107.

(收稿日期: 2016-10-21 修回日期: 2017-01-23)