

基于磁珠的 ABO 血型蛋白质芯片的构建及初步应用分析*

陈艺心, 王甜甜, 孟 强, 王世春, 张 强, 黄梅莓, 赵树铭[△](第三军医大学第一附属医院/中国人民解放军重庆血站, 重庆 400038)

【摘要】 目的 构建一种以磁珠为标记物的, 用于血型检测的可视化蛋白质芯片。**方法** 用人免疫球蛋白 G (IgG) 及磁珠标记的抗人 IgG 进行琼脂糖浓度、点样浓度、温度和固定时间等实验条件的摸索。根据优化的条件, 经过铺片、点样、固定、封闭等程序构建 ABO 血型检测蛋白质微阵列, 加入血液样品进行反应, 最后用磁珠标记的抗体进行检测。**结果** 通过条件的优化发现, 在 1.0% 的琼脂糖基片表面, 以 100 μg/mL 的蛋白质稀释液点样, 之后在 24 ℃ 固定 8 h, 能够得到更优的信号强度。检测不同稀释度的抗原抗体, 正定型效价可达到 1:819 2, 反定型可达到 1:4 096。检测 14 例临床样品, 结果样点清晰、肉眼可见, 且结果判定与试管法一致性达 100%。**结论** 成功构建了基于磁珠的血型检测可视化蛋白质微阵列。

【关键词】 磁珠; 蛋白质微阵列; ABO 血型

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2014.10.004 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2014)10-1306-04

Construction and application of magnetic bead-based protein microarray for ABO blood typing* CHEN Yi-xin, WANG Tian-tian, MENG Qiang, WANG Shi-chun, ZHANG Qiang, HUANG Mei-mei, ZHAO Shu-ming[△] (Department of Blood Transfusion, Southwest Hospital, Chongqing 400038, China)

【Abstract】 Objective To construct a visual blood typing protein microarray based on magnetic bead. **Methods** The optimal experiment conditions, such as agarose concentration, temperature, immobilization concentration and time, were explored on glass-slide with human IgG and anti-human IgG antibody coated magnetic bead. Based on the optimal conditions, an ABO blood typing protein microarray was established by coating, printing, immobilizing and blocking. Then the blood samples were added to the microarrays, and detected with antibody-conjugated magnetic beads. **Results** When the glass slide was coated with 1% agarose, and spotted with the protein probes (100 mg/mL in printing buffer) on the fabricated substrates and incubated in a humid chamber at 24 ℃ for 8 h, better results could be obtained. The forward test titer was up to 1:819 2, and the reverse test was 1:409 6 by detecting different dilution rate of samples with the arrays. 14 clinical specimens were tested with the arrays and tube methods, and the results were same. Each positive spot on the arrays was strong and visible easily to the naked eye. **Conclusion** A system of magnetic bead-based protein array for ABO blood group was successfully constructed.

【Key words】 magnetic bead; protein microarray; ABO blood group

目前临床常规血型检测方法主要有试管法、微柱凝胶法、平板法和全自动血型仪等, 都是基于红细胞的凝集反应来判断血型, 因而会受到如冷凝集等非特异性凝集反应的影响。也有研究利用基因芯片和基于荧光的蛋白质微阵列来进行血型判定^[1-4], 一定程度上可以规避血清学方法的弊端, 但是操作繁琐、耗时, 并且依赖于昂贵的专业仪器。本研究将磁珠与蛋白质微阵列相结合, 结果可通过显微镜甚至肉眼观察, 也可经过 CCD 成像, 为进一步构建高通量、自动化、操作简单、价格适宜的血型及血液相关疾病一体化检测方法打好基础。

1 材料与方法

1.1 主要仪器及试剂 血型抗 A 抗体(ab20131)、血型抗 B 抗体(ab24224)、人 C1q(ab96363)、鸡抗人 C1q 抗体(ab14004) 购自英国 Abcam 公司, A 型/B 型血型抗原(用新鲜红细胞自制), 3-氨丙基三乙氧基硅烷(APTES, 美国 Sigma), 超顺磁性

氧化硅纳米磁珠(SM3-P100, 上海奥润), 巴比妥(天津化学试剂三厂), 巴比妥钠(天津河东区红岩试剂厂), 丙酮(成都科龙化工试剂厂), 戊二醛、琼脂糖、小牛血清清蛋白(BSA)、人免疫球蛋白 G(IgG)、兔抗人 IgG、甘氨酸、高碘酸钠(NaIO₄)、乙基 3-(二甲氨基)丙基碳二亚胺盐酸盐(EDAC)、N-N-羧基琥珀酰亚胺(NHS)、2-吗啉乙磺酸(MES)等均购自上海生工生物工程股份有限公司。Milli-Q 超纯水系统(型号: Integral 5, 美国 Millipore), 倒置显微镜(型号: DMIL LED, 德国 Leica), 超净工作台(型号: YJ-875SA, 苏州), 电热恒温水浴箱(型号: DKB-8A, 上海精宏实验设备公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 抗体与磁珠的偶联 (1)活化: 取 1 mg 羧基化磁珠到离心管中, 用 pH=6.0、0.01 mol/L 的一水合 2-吗啉乙磺酸吐温(MEST, 0.05% Tween-20)溶液洗涤 2 次, 磁分离后移除上

* 基金项目: 全军后勤重大科研项目(AWS11J007-05)。

作者简介: 陈艺心, 女, 在读硕士, 初级检验师, 主要从事输血相关研究工作。 △ 通讯作者, E-mail: shumingzhao@yahoo.com。

清液;用 pH=6.0、0.01 mol/L 的一水合 2-吗啉乙磺酸(MES)溶液分别配制 5 mg/mL 的碳二亚胺(EDC)溶液和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)溶液(现配现用),分别取 100 μ L EDC 和 NHS 溶液,与磁珠充分混匀,37 $^{\circ}$ C 活化 30 min,期间保持磁珠的悬浮状态。(2)偶联:用 MEST 将活化的磁珠洗涤 3 次,再用 pH=7.4、0.01 mol/L 的磷酸盐吐温(PBST, 0.05% Tween-20)洗涤 2 次;加入适量抗人 IgG(鸡抗人 C1q 抗体),用偶联缓冲液 PBST 补足溶液到 250 μ L,振荡偶联过夜。(3)封闭:偶联磁珠磁分离,去上清液后,加入 500 μ L 含 1% BSA 的偶联缓冲液 PBST 封闭 30 min。(4)保存:用 PBST 洗涤 4 次,用 250 μ L 含 0.02% NaN_3 , 0.5% BSA 的 PBST(pH=7.4、0.01 mol/L, 0.05% Tween-20)溶液重悬磁珠,保存于 4 $^{\circ}$ C,待用。

1.2.2 载体的制备 (1)羟基化:将浓硫酸(98%)与浓过氧化氢溶液(30%)按照体积比 3:1 混合制成 piranha 溶液,冷却后,将洁净玻片浸入其中,置于 80 $^{\circ}$ C 水浴箱反应 1 h 后,再静置过夜进行羟基化。(2)硅烷化:将羟基化的玻片用去离子水清洗,晾干,置于 2% 的 3-氨基丙基-三甲氧基硅烷(APTES)丙酮溶液中浸泡 5 min,取出,依次用丙酮和无水乙醇漂洗,自然晾干。(3)琼脂糖铺片:用 pH=8.6、0.05 mol/L 的巴比妥缓冲液配制琼脂糖-甲醛溶液,加热溶解后,每张玻片 2~3 mL,使其均匀平铺于基片表面,待其凝固后 37 $^{\circ}$ C 烘干,备用。

1.2.3 点样和固定 将制好的基片置于 0.02 mol/L 的 NaIO_4 溶液中,室温氧化 30 min,再用去离子水清洗 3 次,晾干后浸入含 1% 戊二醛(GA)的 PBS(pH=7.4、0.01 mol/L)溶液中,37 $^{\circ}$ C 2 h,用去离子水清洗 3 次,晾干备用。用含 40% 甘油的 PBS(pH=7.4、0.01 mol/L)溶液将待固定的抗原或抗体稀释到所需浓度,以每点 0.5 μ L 点样于上述基片表面(图 1A),并将磁珠标记的抗 C1q 抗体和空白稀释液直接点样作为磁标和空白对照,再置于湿盒内,室温过夜固定。

1.2.4 芯片的封闭 取出固定好的基片,用去离子水清洗 3 次,晾干后浸入 1.0 mg/mL 的 BSA(溶于含 1% 甘氨酸的 PBS 溶液)中,37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h,用去离子水洗涤 3 次,晾干备用。

1.2.5 反应与检测 将血液标本用去离子水溶解稀释 100 倍,与等体积人补体 C1q(0.1 mg/mL)混合,以每点 1 μ L 加到各样点处,将芯片放入湿盒内,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min 后,用去离子水洗净、晾干。每个样点再加入磁珠标记的抗人 C1q 抗体 0.5 μ L,孵育 30 min,用 0.05% 的 PBST 倒置洗涤 1 min,再用去离子水轻柔冲洗 5 次,每次 30 s,置超净台吹干,再用显微镜观察结果,反应原理见图 1B。

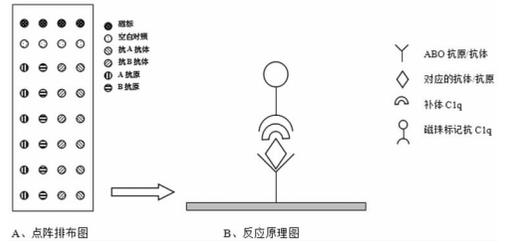
1.3 图像与数据分析 芯片结果用倒置显微镜观察,再用软件 Image J 和 SPSS13.0 进行图像和结果分析。根据 14 例标本正反定型检测结果的灰度值,使用非参数法分别构建 ROC 曲线,并以 Youden 指数最大的切点为临界值,作为各点阴阳性判定的依据。

2 结果

2.1 实验条件优化

2.1.1 琼脂糖浓度对抗体固定的影响 分别用 0.6%、0.8%、1.0%、1.2%、1.4% 的琼脂糖溶液制备琼脂糖基片,将人 IgG 分别点样于各基片,经过固定、封闭后,加入抗人 IgG 偶

联磁珠反应。随琼脂糖浓度的增加,蛋白质的固定量也随之增加,但是当浓度超过 1.0% 时,蛋白质固定量开始降低,见图 2。因此,选择 1.0% 的琼脂糖基片进行后续实验。



注:磁标是直接利用磁珠标记的抗 C1q 抗体点样,一方面监测探针固定效果,另一方面作为整个检测区域的坐标;空白对照是直接利用空白点样,也作为阴性对照;每一种抗原或抗体检测都有 6 个平行点。

图 1 芯片设计示意图

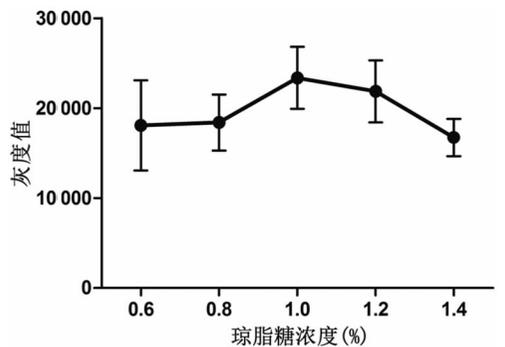


图 2 琼脂糖浓度对抗体固定的影响

2.1.2 点样浓度对信号值的影响 将浓度为 12.5~400 μ g/mL 的人 IgG 点样到 1% 的琼脂糖基片上,固定、封闭后,与抗人 IgG 偶联磁珠孵育,观察结果。如图 3 所示,灰度值随点样浓度的增加而逐渐增加,但当点样蛋白的浓度大于 100 μ g/mL 后信号值反而略微下降,之后趋于平缓,可能是受到空间位阻的影响,并且从图上还可看出 100 μ g/mL 时芯片信号值标准差较小。因此,100 μ g/mL 是较为理想的点样浓度。

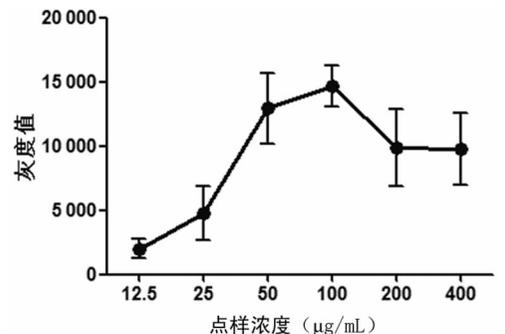


图 3 点样浓度对信号值的影响

2.1.3 温度及固定时间对蛋白质固定效果的影响 芯片点样后,分别置于 4、24、37 $^{\circ}$ C 环境下固定 2、4、8、16、24 h,再洗涤、封闭、反应。在 4 $^{\circ}$ C 下,随着时间的延长,蛋白质的固定率升高,但超过 8 h 后逐渐趋于平稳;24、37 $^{\circ}$ C 条件下,固定 8 h 以内,随时间延长,蛋白质的固定率升高,但超过 8 h 以后反而急剧降低,可能是由于长时间置于该温度下容易导致蛋白质活性降低的原因。24 $^{\circ}$ C 固定 8 h 蛋白质固定率最高,但是不宜超过 8 h,且芯片制好后最好 4 $^{\circ}$ C 保存,见图 4。

2.2 血型芯片的构建及检测

2.2.1 芯片构建及灵敏度评价 分别将抗 A、抗 B、A 抗原、B 抗原以每点 0.5 μL 点样于琼脂糖基片表面,取标准抗 A、抗 B 单克隆抗体和多人份混合 A 型、B 型红细胞,分别用 40% 甘油-PBS 作等倍稀释(红细胞先用适量去离子水溶解后再稀释),与等体积 0.2 mg/mL 的补体 C1q(40% 甘油-PBS 溶液稀释)混合,以每点 1.0 μL 加到相应样点进行反应,最后用磁珠包被的抗 C1q 进行检测。同时用试管法进行正反定型效价的测定。用芯片法进行血型检测,正定型效价可达到 1 : 819 2,反定型效价可达到 1 : 409 6,而试管法检测的正定型效价为 1 : 256,反定型效价仅有 1 : 16,见图 5。

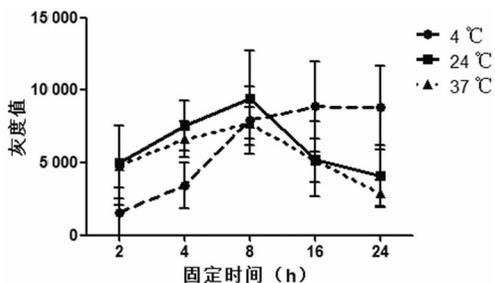


图 4 点样温度及固定时间对固定效果的影响

2.2.2 临床标本检测 按照图 1A 所示构建血型正反定型芯片,将全血标本用去离子水(含 40% 甘油)溶解并稀释 100 倍,再用构建好的血型芯片进行检测,判定血型。如图 6 所示,可以看到芯片结果样点清晰可见。随机抽取了 14 个临床标本,

检测结果灰度值见表 1,其中 A 型 4 例,B 型 2 例,O 型 4 例,AB 型 4 例,结果判定均与试管法检测结果一致,特异性为 100%。

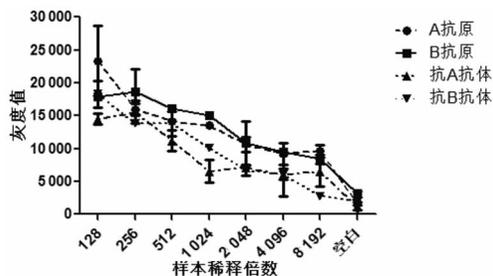
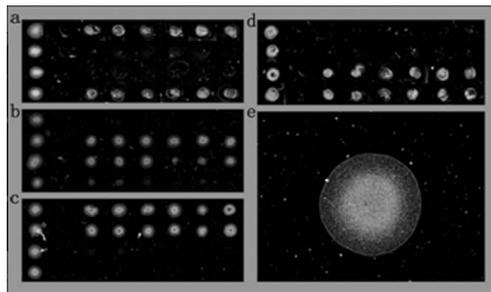


图 5 不同稀释度的抗原抗体检测



注:a,b,c,d 分别为 A、B、AB、O 型标本检测结果;e 为 40×倒置显微镜下的样点。

图 6 临床标本检测结果

表 1 临床标本检测灰度值均数表

固定蛋白	A 型				B 型		O 型				AB 型			
	1	2	3	4	1	2	1	2	3	4	1	2	3	4
抗 A	15 019	11 292	19 670	16 751	531	4 035	685	2 026	1 828	781	15 299	15 490	14 319	16 261
抗 B	2 270	1 158	2 871	1 805	16 528	20 668	887	2 175	2 044	928	15 274	16 909	13 087	15 638
A 抗原	2 103	2 084	4 017	888	11 868	11 649	16 231	14 450	13 983	15 517	404	498	2 682	804
B 抗原	1 1607	8 930	13 664	13 105	2 136	2 461	14 654	16 258	10 277	17 151	392	487	2 105	1 342

注:以 Youden 指数的最大切点为临界点,得出正定型临界值为 7 136,反定型临界值为 5 135(P=0.000)。

3 讨 论

ABO 血型鉴定是日常献血、输血的必检项目,传统的平板法和试管法操作简单,但费时费力,且难以实现自动化和标准化。随着血型鉴定技术的发展,一些新的血型检测方法应运而生,如微孔板法、微柱凝胶法和全自动血液分析仪等,这些方法在一定程度上实现了检测的自动化和批量化,但是相应的仪器昂贵,且检测通量和速度仍不满足临床需求^[5]。

蛋白质微阵列技术最初作为基因芯片功能的补充,用于蛋白质组学的研究,具有高通量平行分析、信噪比高、所需样品量少等特点,现已广泛应用于免疫检测、疾病诊断与药物开发等领域^[6-7]。在血液检测方面,已经有研究运用微阵列技术进行血液传播病毒检测及血型判定等^[8-9],但大部分方法过程较为繁琐,并且需要依赖昂贵的仪器,使其在临床的普及受到限制。而磁珠具有超顺磁性和易分离操作的特点,可连接抗原、抗体、酶及核酸等大分子,若用于标记,结果肉眼可见^[10-12]。此外,本研究引入补体 C1q 作为中间反应介质,利用补体 C1q 能够

并且仅与抗原抗体复合物结合的特点,实现了抗原抗体的同步检测。

蛋白质芯片技术的难点在于探针在载体表面的固定及活性保持,很多因素都可能影响固定效果,包括载体的选择、点样的浓度、温度、时间等^[13-15]。本研究中选择玻片作为载体,价格低廉、处理方便且性能稳定,表面覆盖具有特殊三维孔隙结构的琼脂糖凝胶,经 NaIO₄ 氧化后衍生出活性醛基,形成双功能分子层,比单纯的二维结构更有利于蛋白质的固定及生物活性的维持^[16-17]。作者以人 IgG 点样,使用磁珠标记的二抗进行检测,为之后的实验筛选并确定了最佳条件:以 1.0% 的琼脂糖溶液制作基片,用 40% 的甘油-PBS 稀释探针到 100 μg/mL 进行点样,点样完成后在 24 °C 固定 8 h,固定后封闭 2 h,置于 4 °C 冰箱保存。根据筛选出的实验条件,将 ABO 血型抗原、抗体固定于基片上,分别检测相应不同稀释倍数的标准抗体和红细胞抗原,得出芯片法的正定型效价为 1 : 8 192,反定型效价为 1 : 4 096,与试管法的 1 : 256 和 1 : 16 相比,灵敏度更高。

用构建出的正反定型芯片对随机抽取的 14 例临床血液标本进行血型检测,芯片结果样点清晰、肉眼可见,与试管法检测结果一致性达到 100%。

与传统的玻片法和试管法相比,运用芯片技术进行血型判定具有灵敏度高、标本和试剂用量少、高通量且易于自动化的特点。该芯片技术灵敏度远高于金标准试管法;以补体 C1q 作为中间反应介质,对全血标本进行分析,无需将血浆、血细胞离心分离;可以实现正反定型、甚至是多种血型的一体化检测;由于该血型鉴定技术是基于抗原抗体反应而非红细胞的凝集,因此不受溶血因素的影响,可用于溶血标本或者野战条件下的血型检测;基于磁珠标记的检测方法使芯片技术脱离荧光扫描仪等昂贵仪器的束缚,结果可视化。本研究只是血型鉴定芯片的一个初步构建,整个过程均是手工操作,后期可使用专业设备进行微阵列构建和制作工艺方面的优化,相信可以使芯片在灵敏度和样点均一性方面得到提高,为进一步构建血型及血液相关疾病一体化检测方法打好基础。

参考文献

[1] Reid ME, Denomme GA. DNA-based methods in the immunohematology reference laboratory[J]. *Transfus Apher Sci*, 2011, 44(1): 65-72.

[2] Tournamille C. Molecular biology methods in immunohematology[J]. *Transfus Clin Biol*, 2013, 20(2): 72-79.

[3] Veldhuisen B, van der Schoot CE, de Haas M. Blood group genotyping: from patient to high-throughput donor screening[J]. *Vox Sang*, 2009, 97(3): 198-206.

[4] Malomgré W, Neumeister B. Recent and future trends in blood group typing[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2009, 393(5): 1443-1451.

[5] 杨大楹, 杨成民, 田兆嵩. 临床输血学[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1993: 506-507.

[6] Tu S, Jiang HW, Liu CX, et al. Protein microarrays for studies of drug mechanisms and biomarker discovery in the era of systems biology[J]. *Curr Pharm Des*, 2014, 20(1): 49-55.

[7] Sun H, Chen GY, Yao SQ. Recent advances in microarray technologies for proteomics[J]. *Chem Biol*, 2013, 20(5): 685-699.

[8] Xu R, Gan X, Fang Y, et al. A simple, rapid, and sensitive integrated protein microarray for simultaneous detection of multiple antigens and antibodies of five human hepatitis viruses (HBV, HCV, HDV, HEV, and HGV)[J]. *Anal Biochem*, 2007, 362(1): 69-75.

[9] Hounghamhang N, Vongsakulyanon A, Peungthum P, et al. ABO Blood-Typing Using an Antibody Array Technique Based on Surface Plasmon Resonance Imaging[J]. *Sensor*, 2013, 13(9): 11913-11922.

[10] Aveyard J, Hedegaard T, Bilenberg B, et al. Microfabricated magnetic bead polydimethylsiloxane microarrays[J]. *Microelectron Eng*, 2010, 87(5-8): 760-764.

[11] Sun H, Mo QH, Lin JC, et al. Rapid simultaneous screening of seven clinically important enteric pathogens using a magnetic bead based DNA microarray[J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2011, 27(1): 163-169.

[12] Giakisikli G, Anthemidis AN. Magnetic materials as sorbents for metal/metalloid preconcentration and/or separation[J]. *Anal Chim Acta*, 2013, 30(789): 1-16.

[13] Romanov V, Davidoff SN, Miles AR, et al. A critical comparison of protein microarray fabrication technologies[J]. *Analyst*, 2014, 139(6): 1303-1326.

[14] Barbulovic-Nad I, Lucente M, Sun Y, et al. Bio-microarray fabrication techniques—a review[J]. *Crit Rev Biotechnol*, 2006, 26(4): 237-259.

[15] Wu P, Castner DG, Grainger DW. Diagnostic devices as biomaterials: a review of nucleic acid and protein microarray surface performance issues[J]. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2008, 19(6): 725-753.

[16] Seo JH, Chen LJ, Verkhoturov SV, et al. The use of glass substrates with bi-functional silanes for designing micropatterned cell-secreted cytokine immunoassays[J]. *Biomaterials*, 2011, 32(23): 5478-5488.

[17] Sheng X, Xu X, Zhan W. Development and application of antibody microarray for lymphocystis disease virus detection in fish[J]. *J Virol Methods*, 2013, 189(2): 243-249.

(收稿日期: 2013-10-25 修回日期: 2014-02-21)

(上接第 1305 页)

[7] 王中杰. 微创内固定系统与动力髁螺钉内固定治疗股骨远端骨折的疗效比较[J]. *中国实用医药*, 2013, 8(1): 124-125.

[8] 范久庆, 张德光. Liss 内固定系统治疗股骨远端骨折 25 例分析[J]. *中国误诊学杂志*, 2010, 10(4): 951-952.

[9] 蔡晓冰, 佟大可, 纪方, 等. MIPPO 技术治疗高龄股骨远端骨折[J]. *中国骨与关节损伤杂志*, 2008, 23(4): 321-322.

[10] 张林华, 卜海富, 周健, 等. LISS 钢板在治疗股骨远端骨折中的应用[J]. *安徽医药*, 2010, 14(2): 188-189.

[11] 王沛年. LISS 钢板治疗股骨远端骨折疗效观察[J]. *现代实用医学*, 2010, 22(6): 696-697.

[12] 陈新, 闫旭, 王凯, 等. 微创稳定系统(LISS)和解剖钢板治疗股骨远端复杂骨折的对比研究[J]. *中华骨科杂志*, 2010, 30(3): 260-264.

(收稿日期: 2013-11-19 修回日期: 2014-01-11)