

流感病毒生物传感器检测方法研究进展

董玲娜¹, 刘 瑛¹, 郑黎润¹, 刘 欣²

(1. 十堰市动物卫生监督所, 湖北十堰 442000;

2. 湖北医药学院实验动物中心, 湖北十堰 442000)

摘要: 为解决传统病毒检测方法灵敏度低、操作复杂、费时费力等问题, 研究人员相继开发了基于 DNA、受体、聚糖、适配体和抗体的生物传感器, 包括免疫传感器、DNA 生物传感器、压电晶体生物传感器、电化学免疫传感器、微阵列技术传感器等。这些生物传感器在流感病毒检测方面具有快速、灵敏、准确的优点, 因而开发便携式、自动化的生物传感器是未来研究热点。

关键词: 流感病毒; 生物传感器; 检测

中图分类号: S851.34 文献标识码: C 文章编号: 1005-944X (2018) 10-0074-04

DOI: 10.3969/j.issn.1005-944X.2018.10.020

Research Progress on Biosensor Detection of Avian Influenza Virus

Dong Lingna¹, Liu Ying¹, Zheng Lirun¹, Liu Xin²

(1. Shiyan Animal Health Supervision Institution, Shiyan, Hubei 442000, China ;

2. Experimental Animal Center, Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442000, China)

Abstract: During virus detection, the traditional methods have many shortcomings, such as low sensitivity, complex operation procedure, as well as the time and energy waste. In order to overcome them, various biosensors have been developed by researchers on the basis of DNA, receptor, glycan, aptamer and antibody, including immunosensor, DNA-based biosensor, piezoelectric biosensor, electrochemical immunosensor and microarray-based technology biosensor, etc. These biosensors show common advantages for AIV detection: fast, sensitive and accurate. Hence, the development of portable and automated biosensors would be a hot research topic in the future.

Key words: influenza virus; biosensor; detection

流感病毒严重威胁动物生产、食物供应和人类健康。快速、敏感的病原学早期检测与诊断不仅利于识别潜在的病原体, 而且利于控制传染病蔓延^[1-2]。病原检测方法除了基于病毒分离培养的细胞或鸡胚培养方法外, 还有血凝试验 (HA)、血凝抑制试验 (HI)、中和试验 (NT) 和 ELISA 检测等血清学诊断方法。尽管这些传统方法有效且敏感, 但需要大量病毒颗粒、特殊设备以及复杂的操作。因此, 传统方法用于现场检测仍存在困难^[3],

迫切需要开发高灵敏度和选择性, 而且有效、快速的病毒诊断和鉴定方法。

近来, 国内外学者将目光聚焦于生物传感器。其简单、小型化和潜在的实时分析能力, 被认为可快速有效实现病毒诊断^[4]。本文重点综述可用于流感病毒诊断的生物传感器, 为开发便携式、自动化的生物传感器提供参考。

1 生物传感技术原理与分类

生物传感器是由固化的生物敏感材料作识别元件 (包括酶、抗体、抗原、微生物、细胞、组织、核酸等生物标志物), 与适当的理化换能器 (如氧电极、光敏管、场效应管、压电晶体等) 及信号放大装置构成的分析工具或系统, 具有接受器和转换

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81670272, 8117009); 湖北省创新群体项目 (2016CFA027); 湖北医药学院创新团队项目 (FDFR201601)

通信作者: 刘欣

器的功能。生物感受器是其最重要的组成部分,其生化特性保证了生物标志物检测的高灵敏度和选择性,并且避免了测试样品中的其他微生物或分子干扰。生物传感器将生物感受器与被检测物质之间发生的特定生化作用,通过传感器转换为可测量信号,对记录和显示的许可生物标志物进行定性和定量分析^[5]。

生物传感器按分子识别元件即敏感材料不同,如酶、微生物个体、细胞器、动植物组织、抗原和抗体、核酸等细分为酶传感器、微生物传感器、细胞器传感器、组织传感器、免疫传感器、DNA生物传感器;按换能器不同,如电化学电极、半导体、光电转换、热敏电阻、压电晶体等细分为生物电极传感器、半导体生物传感器、光生物传感器、热生物传感器、压电晶体生物传感器等。

目前,开发用于病毒等病原体检测的生物传感器主要有以下3个目的:(1)用于特异生物标志物的确定与检测分析;(2)提高生物测定方法的稳定性,使其适应野外和/或复杂生物样品的检测分析;(3)提高检测的敏感度,以便在动物出现临床症状之前确诊,防止病毒等病原体潜在地传播。

2 流感病毒生物传感器

尽管生物传感器种类很多,但是因流感病毒的特殊性,至今只开发出部分生物感受器用于检测。

2.1 单一技术生物传感器

2.1.1 免疫传感器 研究发现,流感病毒血凝素(HA)表面蛋白能结合人和禽类细胞表面的唾液酸-聚糖残基(α -2,6和 α -2,3-唾液酸)。禽类流感病毒表达的HA能特异性地与肠道上最先表达的 α -2,3-唾液酸结合。而人类流感病毒表达的HA更倾向于与人上呼吸道上皮细胞的 α -2,6-唾液酸聚糖结合。因此,基于唾液酸结合差异,现已开发了用于检测和区分禽类和人类流感病毒的生物传感器^[6]。大多数基于抗体的流感病毒传感器,都采用侧向流动试验。侧向流动试验可以检测复杂介质中特定的流感生物标志物。通常,抗体可区分A型和B型流感病毒,但不能很好地区分亚型。相反,针对特定流感病毒的特异性RNA/

DNA引物,可区分流感病毒亚型。侧向流动试验具有简单、有效、可靠和非标记检测的特征,虽可检出蛋白质,但仍须改进,以便在粪便拭子样品等复杂基质中检出病毒颗粒^[7]。如:用银纳米颗粒可放大比色信号达1000倍,用量子点放大的侧向流动试验,可检出0.09 ng/mL的最低下限值。最近,基于量子点的侧向流免疫分析系统,可定量检测A型流感病毒的H5和H9亚型。用量子点放大信号对特异性抗体进行修饰,可在紫外灯下定量检出病毒^[7]。

2.1.2 DNA生物传感器 DNA生物传感器采用指数富集配基系统进化(SELEX)技术,可区分流感病毒的不同血清型。核酸适配体是具有既定3D结构的人工核酸,是一种很好的抗体替代品,生产成本低、生产时间短,不需要动物宿主。核酸适配体在皮摩尔范围内可呈现很好的结合亲和力^[8]。因此,与大多数抗体为基础的免疫传感器相比,DNA生物传感器的检测灵敏度更高。目前,已开发出针对流感病毒各种蛋白的适体。这些适体对H5N1和H1N1等特异的流感病毒亚型表现出特异性的结合能力。针对量子点黏附的流感病毒产生的适体,可用于病毒颗粒和超微结构标记的感染样本检测。此外,一些适体可结合HA蛋白位点,识别宿主细胞表面唾液酸,减弱病毒感染性,因而可作为潜在抗病毒药物使用^[9]。

2.1.3 压电晶体生物传感器 已开发的糖基固化场效应晶体管生物传感器可检测并区分超低浓度的人(H1)和禽(H5)流感病毒^[10]。

2.1.4 其他 表面等离子体共振、光波导和石英晶体微平衡等已被用于基于糖基的禽流感病毒检测。HA能结合到纳米金颗粒包被的唾液酸,以此在没有任何预处理或扩增步骤的情况下检测到流感病毒,通过比色能产生与病毒效价成线性比例的特性^[11]。

2.2 多种技术组合生物传感器

2.2.1 电化学免疫传感器 最近,开发了一种基于特异性抗M1抗体的电化学免疫传感器,其可检出A型流感病毒的所有亚型,灵敏度与经典分

子方法 ($80 \times 10^3 \sim 100 \times 10^3$ PFU/mL) 相似。通过将抗 M1 单克隆抗体与金纳米颗粒偶联在石英晶体微平衡分析系统中, 可有效检出更低的病毒 (1×10^3 PFU/mL)。通过与金纳米颗粒修饰碳纳米管结合的特异性抗 M1 抗体, 建立了一种灵敏的等离子体辅助荧光免疫分析方法^[12]。流感病毒与这些混合纳米颗粒结合后, 通过添加碲化镉量子点产生荧光信号, 量子点的荧光所致发光强度随病毒浓度的变化而变化, 检出限为 50 PFU/mL。此外, 电化学免疫传感器为检测和定量分析感染细胞中 A 型流感病毒 PB1-F2 蛋白, 提供了一个非常灵敏的平台, 其检出下限可达 0.42 nm PB1-F2^[13]。另外, 研制的无 PCR 配对表面等离子体光波生物传感器可检出 A 型流感病毒。

2.2.2 微阵列技术传感器 微阵列技术也常用于监测病原体毒力基因或同时筛查多种病原体。大多数流感微阵列利用一系列引物对流感病毒 HA、NA 和 M1 基因进行多重 PCR 扩增。耦合 DNA 微阵列和多重逆转录酶 PCR 微阵列, 利于流感病毒株的分型分析^[14]。最近报道的一种三维 DNA 流式生物芯片, 可用于流感病毒的分型分析; 目前开发了一种专门针对呼吸道病毒检测和基因分型的基因芯片; 针对人群 H1N1、H3N2 的 A 型流感病毒亚型循环以及高致病性禽流感 A/H5N1 病毒, 建立了基于微阵列的快速鉴别方法^[15]。由于微阵列通常经由荧光读出, 因此检测流感病毒的电化学微阵列具有广阔潜力。如, 12 500 多个探针的甲型流感病毒微阵列硅芯片, 能很好地进行 A 型流感病毒 HA 和 NA 蛋白的鉴定和病毒基因亚型分型^[16]。目前, 也设计了基于聚糖的微阵列。在临床检测极限 (10 个斑块形成单位) 之外, 利用微阵列, 其依然能捕获并显示出不同流感病毒毒株的检测结果, 有利于临床相关病毒的诊断。

2.3 生物传感器的优缺点

各种生物传感器在检测流感病毒方面, 表现出了共同的特征: 快速、灵敏、准确, 然而不同方法也有所差别。就灵敏度而言, 传统的免疫生物传感器检出浓度要求高, 而电化学免疫传感器、

压电晶体生物传感器、DNA 生物传感器等能检出极低的浓度。就检测准确性或分型检测而言, DNA 生物传感器利用流感病毒特异性 RNA/DNA 引物, 可更好区分病毒亚型。此外, 多种技术组合也利于病毒亚型检测。这些方法尽管各具优势, 但其共性的问题是大多适用于实验室诊断, 而不利于现场检测^[15]。尽管目前已开发了 PCR、RT-QPCR、RT-RPA 试剂盒和便携式机器的移动诊断箱, 但是为有效整合扩增和检测的稳定性, 提高流感病毒及其亚型的检测灵敏度, 需要将 PCR/ 等温扩增和生物传感器技术相组合^[11]。可见, 开发小型化和自动化的微阵列生物传感器用于构建便携式流感病毒诊断平台是当前研究热点^[16]。

3 小结

综上所述, 不同类型的生物传感器各具优势。基于核酸的生物传感器适合于快速灵敏的测试, 但存在核酸提取和扩增等样品制备的局限; 基于抗体和适体的生物传感器能具体分析病毒亚型, 但这一特征不仅常依赖生物分子的选择性, 而且也取决于它们在传感器表面上固化后的稳定性。尽管这些新技术仍存在一定缺陷, 但它们的广泛使用及其累积的数据将有助于疫病防控, 减低公共健康风险。

参考文献:

- [1] 董玲娜. 从“猪流感”到“甲型 H1N1 流感”看当前动物检疫工作 [J]. 中国动物检疫, 2009, 26 (11): 29-31.
- [2] YOO S M, LEE S Y. Optical biosensors for the detection of pathogenic microorganisms[J]. Trends in biotechnology, 2016, 34 (1): 7-25.
- [3] VASHIST S K, LAM E, HRAPOVIC S, et al. Immobilization of antibodies and enzymes on 3-aminopropyltriethoxysilane-functionalized bioanalytical platforms for biosensors and diagnostics[J]. Chemical reviews, 2014, 114 (21): 11083-11130.
- [4] ZHU C, YANG G, LI H, et al. Electrochemical sensors and biosensors based on nanomaterials and nanostructures[J]. Analytical chemistry, 2014, 87 (1): 230-249.
- [5] VIDIC J, MANZANO M, CHANG C M, et al. Advanced biosensors for detection of pathogens related

- to livestock and poultry[J]. Veterinary research, 2017, 48 (1) : 11.
- [6] MORSE S S, MAZET J A, WOOLHOUSE M, et al. Prediction and prevention of the next pandemic zoonosis[J]. Lancet, 2012, 380 (9857) : 1956-1965.
- [7] HUANG X, AGUILAR Z P, XU H, et al. Membrane-based lateral flow immunochromatographic strip with nanoparticles as reporters for detection: a review[J]. Biosens bioelectron, 2016, 75: 166-180.
- [8] FU Y, CALLAWAY Z, LUM J, et al. Exploiting enzyme catalysis in ultra-low ion strength media for impedance biosensing of avian influenza virus using a bare interdigitated electrode[J]. Analytical chemistry, 2014, 86 (4) : 1965-1971.
- [9] CHENG C, DONG J, YAO L, et al. Potent inhibition of human influenza H5N1 virus by oligonucleotides derived by SELEX[J]. Biochemical & biophysical research communications, 2008, 366 (3) : 670-674.
- [10] DINH H, ZHANG X, SWEENEY J, et al. Glycan based detection and drug susceptibility of influenza virus[J]. Analytical chemistry, 2014, 86 (16) : 8238-8244.
- [11] AHMED A E W, MANFRED W, HUFERT F T, et al. Diagnostics-in-a-suitcase: development of a portable and rapid assay for the detection of the emerging avian influenza A (H7N9) virus[J]. Journal of clinical virology the official publication of the pan American society for clinical virology, 2015, 69: 16-21.
- [12] NIDZWORSKI D, PRANSZKE P, GRUDNIEWSKA M, et al. Universal biosensor for detection of influenza virus[J]. Biosensors & bioelectronics. 2014, 59 (9) : 239-242.
- [13] MIODEK A, SAURIAT-DORIZON H, CHEVALIER C, et al. Direct electrochemical detection of PB1-F2 protein of influenza A virus in infected cells[J]. Biosensors & bioelectronics, 2014, 59 (13) : 6-13.
- [14] CONG F, ZHU Y, LIU X, et al. Development of an xTAG-multiplex PCR array for the detection of four avian respiratory viruses[J]. Mol cell probes, 2018, 37: 1-5.
- [15] SHI L, SUN J S, YANG Z P, et al. Development of a DNA microarray-based multiplex assay of avian influenza virus subtypes H5, H7, H9, N1, and N2[J]. Acta virologica, 2014, 58 (1) : 14-19.
- [16] BERTHET N. Resequencing microarrays: a rapid tool for better identification and understanding of viral and bacterial emergence[J]. Bulletin de l'académie nationale de médecine, 2013, 197 (9) : 1669-1682.

(责任编辑: 侯文婷)