

基于 81° 倾斜光纤光栅的新城疫病毒免疫传感器

罗彬彬^{1,2}, 吴胜昔^{3*}, 王玲玲³, 张中豪³, 徐杨非¹, 蒋棚俊³, 石胜辉¹, 邹雪¹, 鲁姣¹, 赵明富¹, 刘永²

¹重庆理工大学光纤传感与光电检测重庆市重点实验室, 重庆 400054;

²电子科技大学光电信息学院, 四川 成都 610054;

³重庆理工大学药物化学与分子药理学重庆市重点实验室, 重庆 400054

摘要 提出一种基于 81° 倾斜光纤光栅(81°-TFG)的新城疫病毒(NDV)免疫传感器。分析 81°-TFG 传感器的基本原理和传感特性。利用金黄色葡萄球菌蛋白 A(SPA)修饰 81°-TFG 的表面,然后将自制的高纯度新城疫病毒单克隆抗体(MAbs)通过 SPA 分子固定于 81°-TFG 表面,从而制成对 NDV 抗原特异性检测的传感器。实验结果表明:该免疫传感器对 NDV 的探测极限在 0.1 ~ 0.2 ng/mL 之间,检测饱和点约为 1.0 ng/mL;在 0~1.0 ng/mL 范围内具有良好的线性度(R^2 约为 0.982),灵敏度约为 342 pm/(ng · mL⁻¹);且该传感器具有良好的可重用性和对 NDV 抗原的高度特异性,并能用于 NDV 的临床检测。相对于传统的免疫荧光技术、酶联免疫等生化检测方法,本文提出的方法具有免标记、操作简便、快速检测等优点。

关键词 光纤光学; 免疫传感器; 倾斜光纤光栅; 新城疫病毒

中图分类号 TN253 **文献标识码** A

doi: 10.3788/AOS201737.1106001

Newcastle Disease Virus Immunosensor Based on 81° Tilted Fiber Grating

Luo Binbin^{1,2}, Wu Shengxi³, Wang Lingling³, Zhang Zhonghao³, Xu Yangfei¹,
Jiang Pengjun³, Shi Shenghui¹, Zou Xue¹, Lu Jiao¹, Zhao Mingfu¹, Liu Yong²

¹ Chongqing Key Laboratory of Optical Fiber Sensor and Photoelectric Detection,

Chongqing University of Technology, Chongqing 400054, China;

² School of Opto-Electronic Information, University of Electronic Science and Technology of China,

Chengdu, Sichuan 610054, China;

³ Chongqing Key Laboratory of Medicinal Chemistry and Molecular Pharmacology,

Chongqing University of Technology, Chongqing 400054, China

Abstract A type of newcastle disease virus (NDV) immunosensor based on 81° tilted fiber grating (81°-TFG) is proposed. The basic principle and sensing properties of the 81°-TFG are briefly analyzed. Staphylococcus aureus protein A (SPA) is used to modify the surface of 81°-TFG, and then highly purified NDV monoclonal antibodies (MAbs) are immobilized on 81°-TFG surface through SPA molecules. Finally, the NDV immunosensor is successfully developed. The experimental results show that the immunosensor has a lowest limit of detection to NDV of between 0.1 ng/mL and 0.2 ng/mL, gets saturated at about 1.0 ng/mL, and has good linearity with R^2 of about 0.982 and sensitivity of about 342 pm/(ng · mL⁻¹) in the concentration range from 0 to 1.0 ng/mL. In addition, this immunosensor shows good reusability and high specificity to NDV, and can also be used in clinical test for NDV. Compared with the traditional biochemical methods such as immunofluorescence technique, enzyme-linked immunoabsorbent assay, this technique proposed in this paper has the advantages of no mark, simple

收稿日期: 2017-03-28; **收到修改稿日期:** 2017-06-16

基金项目: 国家自然科学基金(61505017, 61327004, 61421002)、中国博士后基金(2016M592649)、重庆市科委基础与前沿研究项目(cstc2014jcyjA0081, cstc2015jcyjA40035)、重庆市高等学校青年骨干教师资助计划、重庆市教委科学技术研究项目(KJ1709192, KJ1709211)、重庆高校创新团队建设计划(CXTDX201601031)、重庆理工大学研究生创新基金(YCX2016103)

作者简介: 罗彬彬(1981—),男,博士,副教授,主要从事光纤传感器技术方面的研究。

E-mail: luobinbin@cqut.edu.cn

* **通信联系人:** E-mail: sxwu2004@cqut.edu.cn

operation, fast detection.

Key words fiber optics; immunosensor; tilted fiber grating; newcastle disease virus

OCIS codes 060.2370; 060.3735; 280.4788; 280.1415

1 引 言

新城疫(NDV)是由新城疫毒株引起禽的一种高度接触性传染病^[1]。NDV 以其传播速度快、致死率高、接触传染性强等特点分布在世界各国,对禽类养殖业造成严重的经济损失,所以世界动物卫生组织(OIE)将其列为 A 类传染病^[2]。病毒基因具有多样性,新城疫病毒特别是高毒株,是一种人畜共患病^[3],其潜伏期约为 48 h,主要引起急性结膜炎^[4-5]。随着检测方法的多样化,病毒的分离与鉴定^[6]、血清学检测[血凝抑制(HI)、血清中和和酶联免疫^[7]等]和分子生物学诊断技术[反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)^[8]、单克隆抗体(MAbs)^[9]和基因芯片^[10]等]等技术方法的应用,使得新城疫的传播得到了较好的控制。但是这些方法因存在误差大、设备要求高、操作繁琐和假阳性等缺点,在临床检测方面受到了很大的限制。鸡群接种疫苗后,鸡新城疫仍然频繁增加。因此,研究一种快速检测 NDV 的方法以及时对疫情进行监控,对于有效防控新城疫具有重大意义。

81°倾斜光纤光栅(81°-TFG)具有折射率(RI)高、灵敏度高、温度交叉敏感性低以及谐振带宽窄等特性,已被用于制作扭度^[11]、液位^[12]、pH 值^[13]及生物标记物^[14]等传感器。本文对光纤表面做硅烷化处理,采用金黄色葡萄球菌蛋白 A(SPA)修饰 81°-TFG 的表面,然后将自制的高纯度 NDV 单克隆抗体固定于 81°-TFG 表面的 SPA 分子层,构建了一种基于 81°-TFG 对 NDV 检测的光纤光栅免疫传感器。通过测定不同浓度等级的高纯度 NDV 溶液,对传感器的探测极限、饱和度、灵敏度、线性度及重用性进行研究;对禽流感病毒(AIV)尿囊液、NDV 尿囊液两种不同的禽类病毒原液和 NDV 空白尿囊液进行对比检测,以鉴定传感器的特异性和临床应用性。

2 81°-TFG 原理、传感特性及实验系统

2.1 81°-TFG 原理和传感特性

采用波长为 244 nm 的倍频 Ar⁺ 激光器(输出功率为 150 nW)和扫描振幅掩模板技术在经过载氢处理的单模光纤内写入极大角度倾斜光栅^[15]。刻写光栅时,振幅掩模板(长度为 3 cm、周期为 6.6 μm)与光纤轴向成 78°夹角;扫描长度,即光栅长度,为 12 mm。制作好光栅后,将其放置在 80 °C 的自然对流烘箱中进行退火处理,以获得稳定的光谱特性。一般而言,极大角度倾斜光纤光栅的角度可以设计和制作在 78.5°~83.0°之间,传感器的折射率灵敏度和温度灵敏度主要受包层模谐振阶数的影响较大,而受其倾斜角度(78.5°~83.0°之间)和光栅周期的影响较小^[16]。为了保证高阶包层模谐振出现在 1550 nm 附近,同时能够获得较高的折射率灵敏度,制作光栅的倾斜角度 θ 选择为 81°,光栅周期约为 32 μm,此时光栅在 C 波段(1530~1565 nm)内对应的高阶包层模谐振的阶数为 32 阶^[16]。

81°-TFG 的耦合光路原理及纤芯区光栅的显微结构分别如图 1(a)和图 1(b)所示,其 81°倾斜光栅条纹可将符合谐振条件的纤芯模耦合到同向高阶包层模,其轴向的光栅周期约为 32 μm,因此 81°-TFG 可看成周期很短的长周期光纤光栅(LPFG)^[17]。极大角度的倾斜光栅条纹造成光栅截面不对称,从而使得 81°-TFG 的每个包层模谐振都具有横电波(TE 模)、横磁波(TM 模)的简并^[15-16],并可通过控制线偏光的偏振方向完全激发 TM 模、TE 模,或同时激励两个简并模,如图 2(a)所示;其全波段光谱如图 2(b)所示(对应某个入射线偏振光方向)。

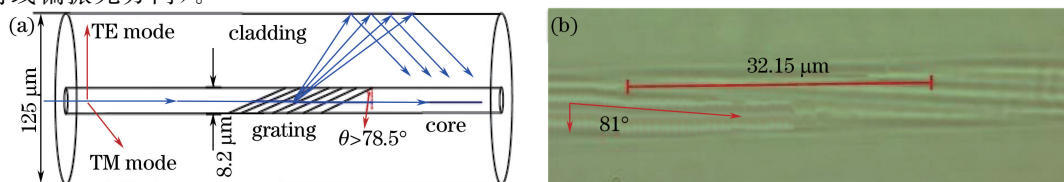


图 1 (a) 81°-TFG 的耦合光路原理模型; (b) 81°-TFG 的纤芯区倾斜条纹的显微图

Fig. 1 (a) Light coupling mechanism of 81°-TFG; (b) micrograph of the tilted fringe in core region of 81°-TFG

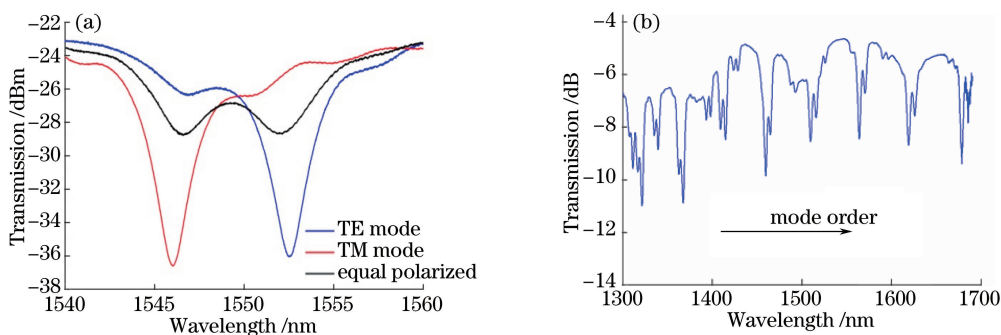


图 2 (a) 81°-TFG 在 C 波段的偏振相关光谱; (b) 81°-TFG 在全波段的谐振光谱

Fig. 2 (a) Polarization correlation spectrum of 81°-TFG in C band;
(b) transmission spectrum within all-spectrum region of 81°-TFG

由 81°-TFG 的相位匹配条件,谐振公式可表示为^[18]

$$\lambda = (n_{\text{eff}}^{\text{co}} - n_{i,\text{eff}}^{\text{cl},m}) \frac{\Lambda_G}{\cos \theta} \quad (1)$$

式中 $i = \text{TE or TM}$, λ 为谐振波长, $n_{\text{eff}}^{\text{co}}$, $n_{i,\text{eff}}^{\text{cl},m}$ 分别为纤芯基模和第 m 阶 TE/TM 包层模的有效折射率, Λ_G 、 θ 分别为原始光栅周期和光栅倾斜角度。研究表明^[15-16]: 81°-TFG 的同谐振峰的温度灵敏度随包层模阶数的增大由 3.0 pm/°C 增至 7.0 pm/°C, 折射率灵敏度随包层模阶数的增大从 120 nm/RIU 增至 280 nm/RIU (RIU 为单位折射率, 折射率 $n = 1.333 \sim 1.380$), 可见其折射率灵敏度较普通 LPFG 高 5~6 倍, 而其温度交叉敏感效应比普通光纤 Bragg 光栅 (FBG) 还要小。此外, 从图 2(a) 可见, 81°-TFG 的谐振带宽为 2.5~3.0 nm, 较 LPFG 的谐振带宽(十几至几十纳米)低一个数量级, 因此其在检测应用中的品质因子 Q 值也比 LPFG 的高一个数量级以上。使用的 81°-TFG 经标定, 其在 C 波段的 TM 模的折射率灵敏度约为 160 nm/RIU (折射率 $n = 1.333 \sim 1.380$), 温度灵敏度约为 4.5 pm/°C。

2.2 实验系统

81°-TFG 免疫传感实验系统如图 3 所示, 光纤光栅传感解调系统 (MOI-SM125, 波长精度为 ± 1 pm) 内含可调谐激光光源 (1510~1590 nm, 1 Hz)。宽带光从其中的一个通道 (CH₁) 输出注入到单模光纤, 并传输到光纤隔离器, 隔离器的引入是为了避免背向散射光和反射光对光源稳定性的影响; 然后经在线起偏器产生线偏振光, 再经偏振控制器 (PC) 控制其工作在 81°-TFG 的 TM 模全激励的状态; 81°-TFG 传感器水平放置于生化反应器皿内, 其另一端利用单模光纤连接到光纤光栅解调系统的另一个通道 (CH₂), 解调后的光谱通过串口输入到计算机上实时显示。

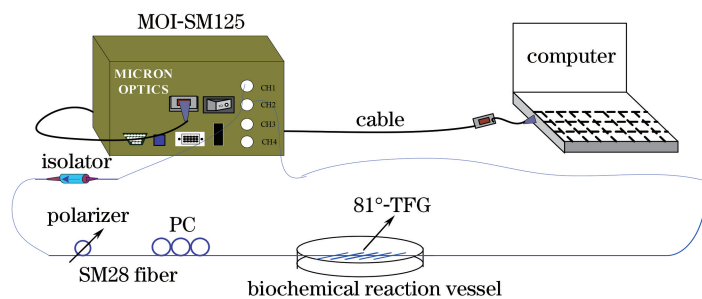


图 3 实验测试系统图

Fig. 3 Diagram of experimental test

3 81°-TFG 免疫传感器的制作

3.1 试剂准备

实验所用化学试剂均为分析纯, 使用的工作液均通过灭菌的去离子水配制。鸡 NDV-AV29 株, 购自中国兽药药品监察所; H5 亚型 AIV 病毒株, 由南京农业大学动物医学院传染病组馈赠; NDV 尿囊液, 取 9 日

龄 SPF(specific pathogen free)鸡胚,每个鸡胚尿囊腔接种新城疫病毒 AV29 株稀释液 0.2 mL,37 °C 孵育,在接毒后 48 h 内收获尿囊液;AIV 尿囊液,方法参照 NDV 尿囊液制备。3-氨基丙基三乙氧基硅烷(APTES,纯度为 99%)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS,纯度为 99%)、1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC,纯度为 99%)、金黄色葡萄球菌蛋白 A、异硫氰酸荧光素(FITC)、聚乙二醇(PEG-1500,分子量 1500),均购自中国 Sigma-Aldrich 公司;2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES)缓冲液(0.1 mol/L, pH 为 5.5~6.7),购自上海化学试剂总厂;三羟甲基氨基甲烷(Tris)、甘氨酸(Glycine)、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)、溶菌酶(Lysozyme),均购自美国 Gen-View Scientific 公司;磷酸盐缓冲液(PBS)(0.01 mol/L,pH 为 7.4)、小鼠免疫球蛋白 G(IgG),均购自武汉博士德生物工程有限公司。

3.2 NDV 单克隆抗体(NDV-MAb)的制备及鉴定

以 NDV 全病毒为抗原免疫 BALB/c 小鼠,取 4 次免疫后的脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞用 PEG1500 进行细胞融合。建立间接酶联免疫吸附实验(ELISA)方法,对融合后的细胞进行筛选,筛选出能分泌 NDV 抗体的杂交瘤细胞(即阳性克隆)。利用有限稀释法进行 3~4 次克隆化筛选,得到能分泌抗体且效价高的单克隆杂交瘤细胞株,采用小鼠体内诱生法将杂交瘤细胞注射于小鼠腹腔内制备单克隆抗体并纯化,通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳及 Western-blot 分别对纯化后的单抗纯度、特异性进行鉴定。制备的 NDV 单抗腹水经 Protein A 柱亲和层析,结果显示 2 个峰,如图 4(a)所示,第 1 个峰为含杂蛋白的穿透峰,第 2 个峰为含有抗体的洗脱峰,所用光源的波长为 280 nm。收集含抗体的洗脱峰,进行 SDS-PAGE 电泳鉴定,结果显示只出现两条带,一条为 25 kDa 的轻链,另一条为 50 kDa 的重链,如图 4(b)所示,表明抗体纯度达到了电泳纯,图中 M 是指的是蛋白 Marker,即蛋白分子量标准品。将 AIV、NDV 作为抗原上样进行 SDS-PAGE 电泳,将凝胶上的病毒蛋白转印至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,加入纯化后的抗体,进行 Western-blot 鉴定,结果显示纯化后的抗体在 NDV 泳道约 60 kDa 处出现条带,而对对照的 AIV 泳道未出现条带,如图 4(c)所示,表明获得的单抗是特异性针对 NDV 的 F 蛋白(60 kDa)。这里需要指出的是,F 蛋白即融合蛋白,以纤突状形式存在于 NDV 囊膜上,F 蛋白主要保护 NDV 并且决定着病毒的毒力大小^[19],F 蛋白被认为能直接调节融合过程,即能促进宿主细胞与病毒的融合,使病毒进入细胞内进行复制而构成致病性^[20]。

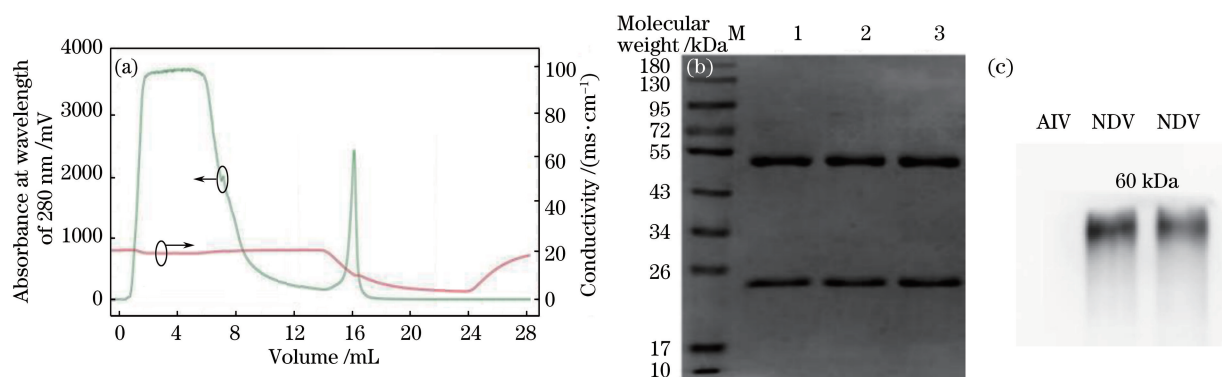


图 4 NDV 单克隆抗体的制备及纯化。(a) Protein A 亲和层析柱纯化 NDV-MAb 图;
(b) 纯化 NDV-MAb 的 SDS-PAGE 鉴定结果;(c) NDV-MAb 的 Western-blot 鉴定结果

Fig. 4 Preparation and purification of NDV-MAb. (a) Purification of NDV-MAb by protein A affinity column;
(b) SDS-PAGE identification of purified NDV-MAb; (c) identification of NDV-MAb with Western-blot

3.3 81°-TFG 的表面修饰及鉴定

免疫传感器表面修饰中使用的 SPA 是一种表面蛋白,均匀分布在金黄色葡萄球菌细胞壁表面,通过羧基(-COOH)端与细胞壁肽聚糖呈共价连接,分子量为 42 kDa^[21]。SPA 多肽链由 A、B、C、D 4 个同源区组成,每个同源区都能与人及某些哺乳动物血清中 IgG 的“Fc 位点结合”,而且不会封闭抗体上能与抗原结合的“Fab 活性位点”,并能使 Fab 的活性位点片段裸露在修饰膜的外层而伸向流动相,从而不影响抗体和抗原的反应活性^[22]。

将 81°-TFG 浸泡于质量分数为 5% 的 HNO₃ 溶液约 1 h,然后用去离子水和无水乙醇清洗光栅表面多次

并晾干;将晾干后的光栅置于洁净的玻璃器皿内待用,将质量分数为 95% 的 H_2SO_4 溶液与质量分数为 5% 的 H_2O_2 溶液以体积比为 5:1 混合(现配现用),将晾干后的光栅浸泡于 H_2SO_4 和 H_2O_2 的混合溶液 1 h 后,设定 70 °C 的温度将其连续烘干,以激活光栅表面的羟基($-OH$);在干燥环境下用硅烷偶联剂 APTES(质量分数为 10%,无水乙醇配制)浸泡光栅 40 min 以在光栅表面生成氨基基团($-NH_2$),用去离子水和无水乙醇清洗光栅表面多次并晾干。在使用 SPA 包被硅烷化光栅表面之前,采用活化剂 EDC/NHS 体系活化 SPA,活化反应体系配比为:10 μ L 质量浓度为 4 mg/mL 的 EDC、10 μ L 质量浓度为 7 mg/mL 的 NHS、48 μ L 质量浓度为 5 mg/mL 的 SPA、132 μ L 质量浓度为 0.1 mol/L 的 MES 缓冲液。SPA 经过羧基活化 15 min 后用 MES 缓冲液稀释至 0.3 mg/mL,用于包被硅烷化光栅反应 4 h;此过程中,SPA 的羧基($-COOH$)与硅烷化光栅表面的氨基($-NH_2$)通过酰胺反应形成共价键结合。然后用 PBS 缓冲液清洗光栅表面多次,以去除没有与光栅表面的氨基基团($-NH_2$)发生共价结合的 SPA 分子。为了证明该方法能够在光纤表面有效地包被 SPA 分子层,在以上表面处理过程中,同时处理几根标准单模裸光纤,其中一根硅烷化后的裸光纤采用标记异硫氰酸荧光素(FITC)的 SPA 进行表面修饰,经过多次表面清洗之后,将仅硅烷化的光纤和 SPA(标记 FITC)修饰过的光纤放置在放大倍率为 200 的倒置荧光显微镜(Olympus Venox)下进行观测,效果分别如图 5(a)、(b)所示,可见硅烷化光纤表面没有激发任何荧光,而 SPA 修饰的光纤表面激发了明显的荧光,说明该修饰方法能够在光纤表面包被一层稳定的 SPA 分子层。

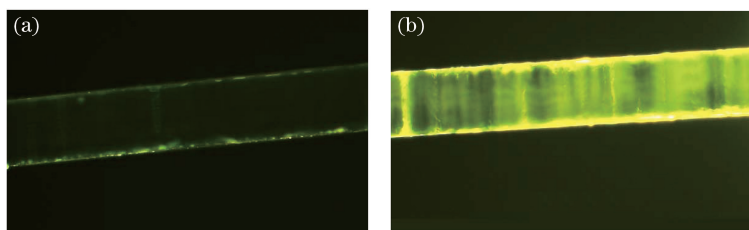


图 5 倒置荧光显微镜下的光纤。(a)硅烷化光纤;(b)SPA(标记 FITC)修饰过的光纤

Fig. 5 Micrograph of fiber observed under the inverted fluorescence microscope.

(a) Silanization fiber; (b) fiber modified by SPA labeled with FITC

最后,用 PBS 缓冲液配制质量浓度为 0.1 mg/mL 的 NDV-MAb 溶液,并使用该溶液浸泡经过 SPA 修饰的光栅 40 min,在此孵化过程中,NDV-MAb 的“Fc 位点”将与 SPA 分子的多肽链相连接;再使用 PBS 缓冲液冲洗光栅若干次以去除其表面未结合的 NDV-MAb 分子,最终制成对 NDV 具有特异性检测能力的 81°-TFG 免疫传感器。经过以上表面处理过程,光纤表面的化学键链接如图 6(a)所示。

以上表面修饰的每个步骤中,用图 3 所示的实验系统测试 81°-TFG 的光谱(PBS 溶液环境下),结果如图 6(b)所示。可见,从裸光栅(bare)、硅烷化(APTES)、SPA 修饰到 NDV-MAb 固定,每个步骤中 81°-TFG 的谐振波长相对于前一处理步骤都发生了红移,红移量依次约为 0.385,0.255,0.210 nm。这是由于传感器表面增加不同厚度的分子层时,其包层膜的有效折射率将增大,而光栅的 RI 灵敏度为正值,因此导致谐振波长的红移。

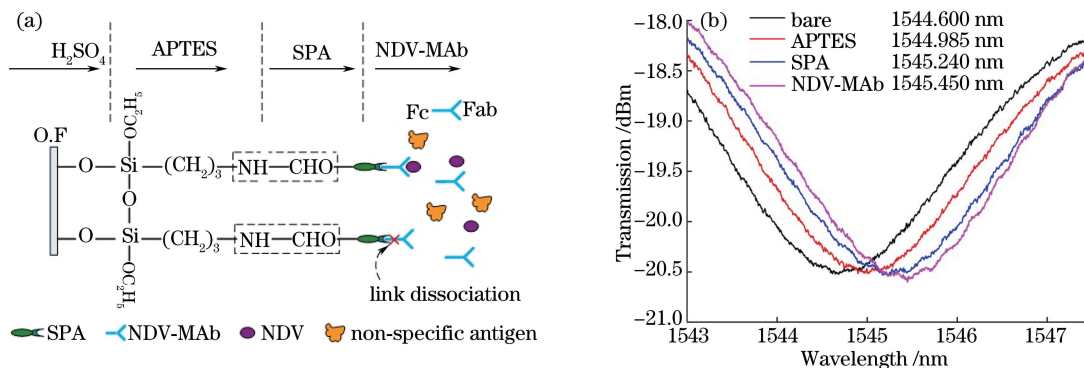


图 6 (a)光栅表面的化学键链接机制;(b)81°-TFG 表面处理过程的光谱变化图

Fig. 6 (a) Chemical link mechanism of fiber surface; (b) spectrum evolution of 81°-TFG in surface process

4 实验分析与讨论

4.1 NDV 的浓度等级检测

实验中,采用 PBS 缓冲液配制纯化的 NDV 溶液,质量浓度等级为 0.05, 0.10, 0.20, 0.60, 1.01, 24.0 ng/mL。采用图 3 所示的实验系统,对每个浓度等级进行测试,用移液体器将 0.3 mL 的 NDV 溶液滴定并覆盖整个 81° -TFG 的表面,待光谱趋于稳定后,用 PBS 缓冲液冲洗光纤表面和生化反应器皿后,再将 1 mL 的 PBS 缓冲液滴定并覆盖整个 81° -TFG,并记录其在 C 波段 TM 模全激励条件下的光谱。实验发现,随着所测试 NDV 溶液的浓度等级的增加(0.1 ~ 1.0 ng/mL),每次检测时传感器光谱达到稳定状态所需要的时间也逐渐延长(5 min 增加至 20 min),这是因为越高浓度等级的 NDV 溶液意味着 81° -TFG 表面有更多的 NDV 抗原参与特异性的结合,所以需要更长的免疫反应时间。实验得到 81° -TFG 免疫传感器的光谱随 NDV 溶液浓度等级的变化如图 7(a) 所示,对应的谐振中心波长的变化如图 7(b) 所示。

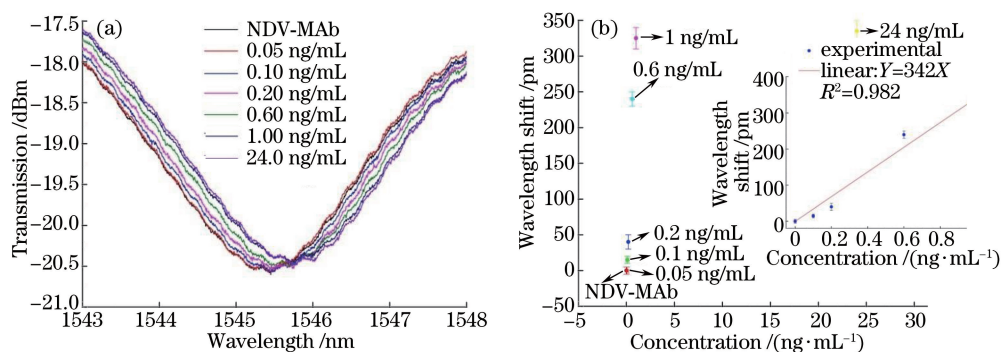


图 7 (a)不同浓度等级 NDV 溶液下 81° -TFG 免疫传感器的光谱变化;(b)对应的谐振波长变化

Fig. 7 (a) Spectra of the 81° -TFG immunosensor under NDA solutions with different concentrations;
(b) corresponding wavelength shift

由图 7 可见,浓度为 0.05 ng/mL 的 NDV 溶液,传感器的谐振光谱基本未发生变化和漂移,但当 NDV 溶液的浓度分别为 0.1 ng/mL 和 0.2 ng/mL 时,谐振光谱分别发生了 15 pm 和 45 pm 的红移,可见已超出光栅解调仪的波长检测误差范围的 ± 5 pm,据此,该免疫传感器的探测极限估计可在 0.1~0.2 ng/mL 之间。这是由于实验中使用的高纯度 NDV 的分子量高达 60 kDa,如图 4(c) 所示,因此当光栅表面的 NDV-MAb 与 NDV 仅发生极少量的特异性结合时就能观测到谐振光谱的红移。此外,当 NDV 溶液的浓度为 1.0 ng/mL 和 24 ng/mL 时,谐振光谱的红移量基本相同(分别为 325 pm 和 335 pm)。这是由于随着测试次数的增加和 NDV 溶液浓度等级的增大,光栅表面能够对 NDV 抗原进行特异性结合的 NDV-MAb 分子的“Fab 位点”越来越少,即逐步趋于饱和。因此,该免疫传感器对 NDV 的检测饱和点为 1.0 ng/mL。单抗与 SPA 发生非特异性结合会达到一定的饱和度,而单抗与抗原的结合是特异性结合,结合抗原的量主要取决于抗体的亲和力和抗原的分子量等因素。NDV 是大分子抗原,其 F 蛋白分子量约为 60 kDa,如图 4(c) 所示,因此在其他因素相同的条件下,与 NDV-MAb 结合的 NDV 的量要少于小分子单抗结合的抗原量,这也是该免疫传感器的检测范围不够大的原因。对图 7(b) 中 0~1.0 ng/mL 的 NDV 浓度区域进行线性拟合,如内插图所示,可得该浓度范围内传感器的灵敏度约为 $342 \text{ pm}/(\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1})$ 、线性度 R^2 约为 0.982,表明该光栅免疫传感器在其检测范围内具有良好的线性度。

4.2 免疫传感器的可重用性测试

完成 NDV 溶液检测之后,为了去除 81° -TFG 免疫传感器表面特异性结合的 NDV 分子,将光栅浸泡在平衡液(亲和平衡液为 20 mmol Tris-HCl, pH 为 7.3~7.5,添加 150 mmol NaCl)中平衡 3 个体积,用洗脱液(亲和洗脱液为 0.2 mol Gly-HCl, pH 为 3.0~3.2)洗脱 6~7 次,用再生液(亲和再生液为 5.8 mL/L 无水醋酸, pH 为 3.0)清洗 3 次。然后将传感器置于在 PBS 溶液中检测其光谱,结果表明其在 C 波段 TM 模的谐振波长约为 1545.250 nm,与第 1 次表面处理中 SPA 修饰后的谐振波长 1545.240 nm 基本一致,如图 6(b) 所示,这说明用于 NDV 溶液测试之后的传感器经以上表面处理过程,其表面的 NDV-MAb 分子已基本上从呈酰胺反应固定的 SPA 分子层解离,如图 6(a) 所示。最后,用质量浓度为 0.1 mg/mL 的 NDV-MAb 溶液(PBS

缓冲液配制)浸泡光栅 40 min,再用 PBS 缓冲液和去离子水将光栅清洗多次后,在 PBS 环境下检测其谐振波长的相对漂移量,结果如图 8 的 Step 2 所示,其谐振波长发生了 0.29 nm 的红移,与第 1 次固定 NDV-MAb 分子时的相对红移量(0.255 nm)相当,说明 NDV-MAb 已重新成功固定于光栅表面的 SPA 分子层。

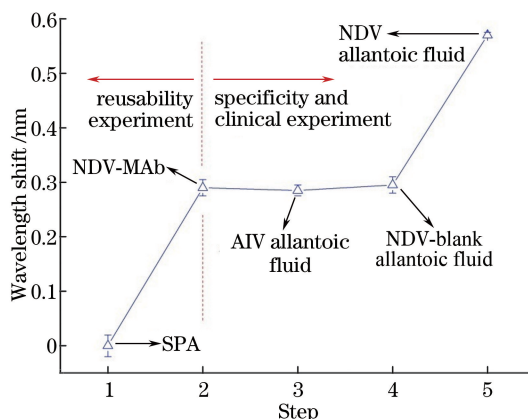


图 8 81°-TFG 免疫传感器的重用性、特异性和临床性测试的谐振波长变化

Fig. 8 Resonant wavelength shift of 81°-TFG immunosensor under the reusability, specificity and clinical experiments

4.3 NDV 的特异性及临床性测试

1)使用重新固定了 NDV-MAb 分子的传感器检测禽流感病毒原液(即 AIV 尿囊液)和不含 NDV 的病毒原液(即 NDV 空白尿囊液),每次检测反应 30 min 后使用 PBS 缓冲液和去离子水冲洗多次,并记录传感器在 PBS 环境下的光谱。由于尿囊液中含有许多其他生物分子杂质(如:杂蛋白、生物盐、细胞等),SPA 分子也能够与其他多种病毒抗体相结合,因此,这两个检测步骤不仅能够鉴定该 NDV 免疫传感器对 NDV 抗原结合的特异性,还能够鉴定传感器表面的活性 SPA 分子是否已经被 NDV-MAb 的“Fc 位点”完全封闭。检测结果如图 8 的 Step 3 和 Step 4 所示,可见这两个步骤中传感器的谐振波长相对于重新固定 NDV-MAb 分子步骤(即 Step 2)的变化仅为 ± 5 pm,与光栅解调系统的误差范围相当,可认为未发生光谱红移。由此可见,该 NDV 免疫传感器对 AIV 尿囊液和 NDV 空白尿囊液没有任何结合特异性的能力,同时也说明使用 0.1 mg/mL 的 NDV-MAb 溶液包被该光栅传感器,足以将其表面的 SPA 分子完全封闭。

2)使用该传感器测定通过病毒扩增的 NDV 病毒原液(即 NDV 尿囊液),测试方法同上。结果如图 8 的 Step 5 所示,可见传感器的谐振波长相对于重新固定 NDV-MAb 分子的步骤(即 Step 2)红移了 0.28 nm,与第 1 次检测的高纯度 NDV 溶液(1.0 ng/mL 和 24 ng/m)的红移量(分别为 0.325 nm 和 0.335 nm),见图 7(b)。但是前者的红移量较后者略低,这是由于 NDV 尿囊液内含整个 NDV 病毒,属于临床检测,而之前检测用的 NDV 是经纯化后的,含有高浓度的抗原蛋白。

5 结 论

实验制备出一种基于 81°-TFG 的 NDV 免疫传感器,分析了 81°-TFG 传感器的基本原理和传感特性。对光栅表面进行生物传感功能化处理,依次经过光纤表面硅烷化、包被 SPA 和固定 NDV-MAb 3 个步骤,其中 SPA 分子通过共价键方式与硅烷层牢固地连接。通过检测不同浓度等级的高纯度 NDV 溶液,得到该免疫传感器对 NDV 的探测极限在 0.1 ~0.2 ng/mL 之间,检测饱和点约为 1.0 ng/mL,在 0~1.0 ng/mL 范围内具有良好的线性度(R^2 为 ~ 0.982),灵敏度约为 342 pm/(ng · mL⁻¹);用配制的洗脱液将光栅表面的 NDV-MAb 分子与 SPA 分子的连接断开,并重新固定新的 NDV-MAb 分子,实现了传感器良好的可重复利用性。通过对 AIV 尿囊液、NDV 尿囊液 2 种不同的禽类病毒原液和 NDV 空白尿囊液进行对比检测,结果表明:该传感器对 NDV 具有高度的特异性,且达到了临床应用的水平,具有免标记、操作简便、快速检测等优点。采用的光栅表面处理方法也可能用于制作检测其他类型病毒的高度特异性以及可重复利用的免疫传感器的研究。

6 致 谢

感谢英国 Aston 大学的光子技术研究所(AIPT)的张琳教授和华中科技大学的闫志君副教授提供制作 81°-TFG 的相关设备及测试等技术支持。

参 考 文 献

- [1] Alexander D J. Newcastle disease[J]. *British Poultry Science*, 2001, 42(1): 5-22.
- [2] Stear M J. OIE manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals: Mammals, birds and bees[M]. London: Cambridge University Press, 2012: 555-574.
- [3] Jin Yining, Hu Zhongming, Feng Shuzhang, *et al.* Human and animal comorbidities[M]. Beijing: Science Press, 2007: 345-358.
金一宁, 胡仲明, 冯书章, 等. 新编人兽共患病学[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 345-358.
- [4] Sanchez D, Pelayo R, Medina L A, *et al.* Newcastle disease virus: Potential therapeutic application for human and canine lymphoma[J]. *Viruses*, 2016, 8(1): E3.
- [5] Bi Yuhai, Xu Ming, Li Zhijie, *et al.* Newcastle disease and human health[J]. *Animal Health*, 2006(9): 11-12.
毕玉海, 徐明, 李志杰, 等. 新城疫与人类健康[J]. *动物保健*, 2006(9): 11-12.
- [6] Chen X Q, Li Z B, Hu G X, *et al.* Isolation, identification, and sequencing of a goose-derived newcastle disease virus and determination of its pathogenicity[J]. *Avian Diseases*, 2015, 59(2): 235-243.
- [7] Swain P, Verma K C, Kataria J M, *et al.* Monoclonal antibody based dot-enzyme linked immunosorbent assay (Dot-ELISA) and agar gel precipitation test (AGPT) for identification of Newcastle disease virus (NDV)[J]. *Indian Journal of Experimental Biology*, 1999, 37(10): 1037-1038.
- [8] Qiu X S, Yu Y, Yu S Q, *et al.* Development of strand-specific real-time RT-PCR to distinguish viral RNAs during newcastle disease virus infection[J]. *The Scientific World Journal*, 2014(2014): 934851.
- [9] Sun Y J, Chen H J, Song C P, *et al.* Preparation of monoclonal antibodies against HN protein of class I newcastle disease virus virulent strain[J]. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2010, 26(5): 464-466.
- [10] Zhao Yujia, Huang Ning, Wen Yiping, *et al.* Development of a microarray for simultaneous detection of newcastle disease virus, infectious bronchitis virus and infectious laryngotracheitis virus[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2015, 45(9): 952-958.
赵玉佳, 黄宁, 文翼平, 等. 新城疫病毒传染性支气管炎病毒和传染性喉气管炎病毒共检基因芯片的构建[J]. *中国兽医科学*, 2015, 45(9): 952-958.
- [11] Chen X, Zhou K, Zhang L, *et al.* In-fiber twist sensor based on a fiber Bragg grating with 81° tilted structure[J]. *IEEE Photonics Technology Letters*, 2006, 18(24): 2596-2598.
- [12] Mou C B, Zhou K M, Yan Z J, *et al.* Liquid level sensor based on an excessively tilted fibre grating[J]. *Optics Communications*, 2013, 305: 271-275.
- [13] Luo Binbin, Zou Wengen, Zhao Mingfu, *et al.* pH sensor based on fiber grating with extremely large tilt angle and its sensitivity enhancement[J]. *Acta Optica Sinica*, 2017, 37(1): 0106009.
罗彬彬, 邹文根, 赵明富, 等. 极大倾斜角度光纤光栅 pH 值传感器及其增敏研究[J]. *光学学报*, 2017, 37(1): 0106009.
- [14] Luo B B, Wu S X, Zhang Z H, *et al.* Human heart failure biomarker immunosensor based on excessively tilted fiber gratings[J]. *Biomedical Optics Express*, 2017, 8(1): 57-67.
- [15] Zhou K M, Zhang L, Chen X F, *et al.* Optic sensors of high refractive-index responsivity and low thermal cross sensitivity that use fiber Bragg gratings of >80° tilted structures[J]. *Optics Letters*, 2006, 31(9): 1193-1195.
- [16] Yan Z J, Wang H S, Wang C L, *et al.* Theoretical and experimental analysis of excessively tilted fiber gratings[J]. *Optics Express*, 2016, 24(11): 12107-12115.
- [17] Shu X W, Zhang L, Bennion I. Sensitivity characteristic of long-period fiber gratings [J]. *Journal of Lightwave Technology*, 2002, 20(2): 255-266.
- [18] Zhou K M, Zhang L, Chen X, *et al.* Low thermal sensitivity grating devices based on ex-45° tilting structure capable of forward-propagating cladding modes coupling[J]. *Journal of Lightwave Technology*, 2006, 24(12): 5087-5094.
- [19] Heiden S, Grund C, Roder A, *et al.* Different regions of the newcastle disease virus fusion protein modulate pathogenicity[J]. *Plos One*, 2014, 9(12): e113344.

- [20] Qin Z M, Tan L T, Xu H Y, *et al.* Pathotypical characterization and molecular epidemiology of newcastle disease virus isolates from different hosts in China from 1996 to 2005[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008, 46(2): 601-611.
- [21] Sjoquist J, Meloun B, Hjelm H , *et al.* Protein A isolate from staphylococcus aureus after digestion with lysostaphin [J]. *The FEBS Journal*, 1972, 29(3): 572-578.
- [22] Kangwa M, Yelemane V, Polat A N, *et al.* High-level fed-batch fermentative expression of an engineered Staphylococcal protein A based ligand in *E. coli*: Purification and characterization[J]. *AMB Express*, 2015, 5(1): 70-79.