

白细胞识别与计量生物传感器的研究

A Study on the Voltammetric Biosensor for Discriminating and Counting Human Leukocyte

蔡豪斌 许春向*

Cai Haobin Xu Chunxiang

(桂林医学院生物工程研究所 桂林市屏风路 8号 541004)

(Biomedical Institute of Guilin Medical College, 8 Pingfenglu, Guilin, Guangxi, 541004)

摘要 介绍一种以平面热解石墨电极为工作电极,用于识别与计量健康人白细胞的半微分伏安型生物传感器。在本传感器上建立健康人淋巴细胞及粒细胞的识别模式,用本传感器计量细胞数,当活细胞数在 $(1.8 \sim 18.1) \times 10^4$ cells 范围内,循环扫描峰电流的半微分峰值与细胞数之间存在着良好的线性相关 ($r = 0.9888$)。

关键词 细胞识别 生物传感器 半微分循环伏安法 人白细胞 人粒细胞 人淋巴细胞

中图分类号 R 318.6

Abstract A Biosensor which can discriminate and count the human leukocyte is reported. The leukocyte on trap membrane applied to basal plane pyrolytic graphite electrode is detected with semi-differential voltammetry in phosphate buffered solution. The model of discriminating human granulocyte and lymphocyte has been constructed. A good line correlation between cell numbers blocking trap membrane and semi-differential peak current has been obtained in the range of cell numbers from 1.8×10^4 to 18.1×10^4 cells ($r = 0.9888$).

Key words cell discrimination, biosensor, semi-differential voltammetry, Human leukocyte, Human granulocyte, Human lymphocyte

生物活细胞的识别与计量在临床医学、食品工业、环境科学及生物工程等领域都具有重要意义。用电化学生物传感器测定细胞总数的报道已有多^[1-3],近几年来连续报道了一些以细胞表层成分为敏感材料的生物传感器,用于识别微生物及动物细胞。相泽益男^[4]报道了能识别小鼠的 T、B 淋巴细胞的免疫传感器, T. Matsunaga 等人则建立了以平面热解石墨电极为工作电极的伏安型生物传感器,用于检测啤酒酵母菌^[5]和致敏原^[6]。但用于人类活细胞检测的生物传感器,至今尚未见报道。本文利用自制的平面热解石墨电极为工作电极,结合现代伏安技术的理论和方法,研究了人类正常白细胞的半微分循环伏安响应,提出了识别淋巴细胞及粒细胞的几个电化学

指标。

1 实验部分

1.1 仪器及实验装置

平面热解石墨电极(自制,石墨块由中国科学院沈阳金属研究所提供)为工作电极,与铂辅助电极及银/氯化银参比电极(江苏金坛分析仪器厂)构成传统的三电极体系,电解池为玻璃夹层结构,容积约 10 mL,与一超级恒温流通水浴器相连构成流通恒温水浴系统,以控制电解池内温度在 $(37 \pm 0.1)^\circ\text{C}$ 。电极体系与一台 HS-1 型微机化极谱仪(福建三明无线电二厂)连接,以完成半微分循环伏安扫描。极谱仪输出的伏安信号由一台 CR-3A 谱图处理仪(Shimadzu, JAPAN)记录并对峰位置及峰高进行自动处理。循环伏安扫描的闭合曲线由极谱仪附带的 CRT 显示。与 CR-3A 相连的软磁盘驱动器(FDD)将每次扫描的伏安图谱储存在软磁盘上,以供大量图谱的对比分析。电极系统及仪器配置如图 1 所示。

1998-05-11 收稿

* 哈尔滨医科大学生物传感器研究室,黑龙江哈尔滨市东大直街 42 号,150086(Biosensor Technology Laboratory, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150086)

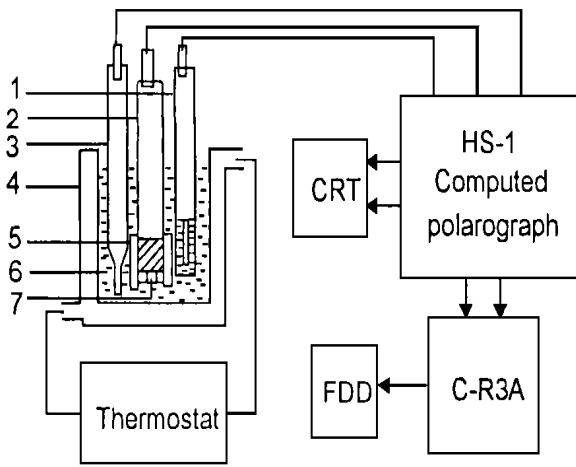


图 1 电极系统及实验装置示意图

Fig. 1 Scheme of electrodes system and apparatus

1 Ag/AgCl参比电极 Reference electrode; 2平面热解石墨电极 Work electrode; 3铂辅助电极 Counter electrode; 4流通水浴池 Electrolyzer; 5细胞阻留膜支架 Holder of trap membrane; 6磷酸缓冲生理盐水 PBS; 7细胞阻留膜 Trap membrane of leukocyte.

1.2 试剂与材料

配制磷酸缓冲生理盐水 (PBS KH_2PO_4 1.5 mmol/L, Na_2HPO_4 6.2 mmol/L, KCl 2.7 mmol/L, NaCl 137 mmol/L, pH值 = 7.000), 所用试剂均为分析纯, 实验用水为超纯水, 由一台 UHQ 纯水器 (Eagastat, England) 在临用前制备。实验室用的白细胞是从健康献血员的静脉血中分离, 经 PBS 溶液离心洗涤后, 重悬浮在 PBS 溶液 (pH值 = 7.000) 中, 制成一定浓度的细胞悬液。细胞悬液的浓度用显微镜下平板计数法确定。

1.3 白细胞循环伏安检测的一般步骤

定量吸取一定浓度的细胞悬液 $50\ \mu\text{L} \sim 200\ \mu\text{L}$ 滴加到硝酸纤维滤膜 (Gibco, USA) 上制成细胞阻留膜, 然后立即将此细胞阻留膜附着在平面热解石墨电极上, 以 PBS (pH值 = 7.000) 为底液, (37 ± 0.1) $^\circ\text{C}$ 温度环境中, 在 $0.000\ \text{V} \sim 1.000\ \text{V}$ (vs Ag/AgCl) 电压范围内, 以一定的扫描速率进行微分循环伏安扫描。

2 结果及讨论

2.1 健康人淋巴细胞及粒细胞在平面热解石墨电极上的响应情况

图 2 是健康人淋巴细胞及粒细胞在平面热解石墨电极上的半微分循环伏安响应的闭合曲线。

结果显示, 在给定的实验条件下, 健康人淋巴细胞和粒细胞均在 +600 mV 左右呈现一个明显的氧化峰。已有许多研究报道了微生物活细胞在平面热解

石墨电极上的伏安响应^[5,7], 啤酒酵母菌、革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均在 +0.6 V ~ 0.7 V 呈现一个氧化峰。Tadashi 等人研究了哺乳动物鼠的白细胞在平面热解石墨电极上的伏安响应^[6], 鼠淋巴细胞及鼠嗜碱性粒细胞性白血病白细胞分别在 +0.65 V 及 +0.72 V 处呈现一个氧化峰, 并证实存在于细胞膜上的辅酶 A 是细胞与平面热解石墨电极间的电子传递体。为此, 我们也用本实验系统进行了辅酶 A 的半微分循环伏安实验, 结果如图 3。

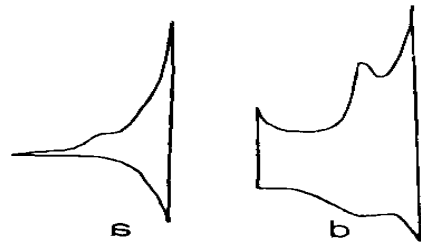


图 2 健康人淋巴细胞与粒细胞在平面热解石墨电极上的响应

Fig. 2 Semi-differential cyclic voltammograms of lymphocyte and granulocyte from health person
a. $E_p = 574\ \text{mV}$, $v = 100\ \text{mV/sec}$, 1.7×10^6 cells; b. $E_p = 621\ \text{mV}$, $v = 100\ \text{mV/sec}$, 6.5×10^6 cells.



图 3 辅酶 A 在平面热解石墨电极上的响应

Fig. 3 Semi-difference cyclic response of CoA in solution $E_p = 551\ \text{mV}$, $v = 100\ \text{mV/sec}$

可见辅酶 A 在 +550 mV 左右呈一明显的氧化峰, 此峰电位略低于健康人白细胞的氧化峰电位, 这是由于辅酶 A 作为电子传递体, 在溶液中有较细胞膜快的电子传递速率的缘故。因此, 可以推测辅酶 A 也是人白细胞与平面热解石墨电极间的电子传递体。众所周知, 辅酶 A 是丙酮酸脱氢酶体系及 α -酮戊二酸脱氢酶体系的辅酶。丙酮酸脱氢酶体系催化丙酮酸脱羧生成乙酰辅酶 A 的反应, 是三羧酸循环的起始反应; 而 α -酮戊二酸脱氢酶体系所催化的反应, 则是三羧酸循环的组成部分。三羧酸循环是细胞生物氧化获取能量即分解代谢的最终共同途径, 又由于合成代谢中的许多关键性物质均需从三羧酸循环中获取, 因此, 辅酶 A 是生物活细胞进行新陈代谢活动的关键。

性物质^[10,11], 由于辅酶 A 在石墨电极上的响应实质上是巯基 (R-SH) 的被氧化^[12], 这与辅酶 A 在活细胞内参与生物氧化反应生成乙酰辅酶 A 的过程相类似。因此, 细胞表层结构及成分的不同, 细胞新陈代谢水平的差异, 将导致细胞在平面热解石墨电极上的不同响应。换言之, 细胞在平面热解石墨电极上的不同响应, 将能直接反应细胞表层成分和结构的差异和细胞不同的新陈代谢状况。

2.2 峰电位的重现性

为考察峰电位 E_p 作为白细胞识别指标的可行性, 使用健康人粒细胞进行了峰电位的重现性实验:

(1) 用浓度为 4.85×10^6 cells/mL 的同一健康人粒细胞悬液, 每次准确吸取 $100 \mu\text{L}$ 制成细胞阻留膜, 以 100 mV/s 的电位扫描速率记录伏安曲线, 共进行 6 次扫描, 其峰电位结果如表 1 所示:

(2) 用浓度为 4.85×10^6 cells/mL 的同一健康人粒细胞悬液, 每次吸取不同量制成膜上细胞数不同的细胞阻留膜, 以 100 mV/s 的电位扫描速率记录伏安曲线, 共进行 6 次扫描, 其峰电位结果如表 2 所示。

(3) 用来自 6 名健康人的粒细胞悬液, 制成细胞阻留膜, 以 100 mV/s 的电位扫描速率记录伏安曲线, 其峰电位结果如表 3 所示:

以上 3 个峰电位重现性实验结果表明, 无论是同一样品相同数量的细胞 (表 1), 还是同一样品不同数量的细胞 (表 2), 以及不同样品 (同一类细胞) 不同数量的细胞 (表 3), 其半微分循环伏安扫描的氧化峰电位均有令人满意的重现性。

表 1 同一样品相同细胞数量的峰电位重现性实验

Table 1 Reproducibility of Leukocyte peak potential of the same sample with equal number of cells

序号 No.	峰电位 Peak potential mV	序号 No.	峰电位 Peak potential mV
1	622	4	621
2	622	5	622
3	622	6	621

电位扫描速率 $v = 100 \text{ mV/s}$, 变异系数 $CV = 0.076\%$ 。

2.3 健康人淋巴细胞与粒细胞的识别

图 2 中 a、b 两条循环伏安扫描的闭合伏安曲线表明, 健康人淋巴细胞与粒细胞在平面热解石墨电极上的响应具有明显的差异: 对于同样的电位扫描速率, 淋巴细胞的氧化峰电位 E_p 略低于粒细胞的氧化峰电位 ($574 \text{ mV}/621 \text{ mV}$); 尤其明显的是, 淋巴细胞的还原回扫未见与氧化扫描相对应的还原峰, 而粒细胞的还原回扫则可见一明显可辩的还原峰。改变电位扫描速率 v , 淋巴细胞的 e_p (峰电流的半微分)

表 2 同一样品不同细胞数量的峰电位重现性实验

Table 2 Reproducibility of Leukocyte peak potential of the same sample with unequal number of cells

序号 No.	膜上细胞数 Cell numbers no membrane ($\times 10^5$ cells)	峰电位 Peak potential mV
1	4.85	622
2	9.70	622
3	9.97	621
4	19.4	622
5	12.1	628
6	14.5	621

电位扫描速率 $v = 100 \text{ mV/s}$, 变异系数 $CV = 0.39\%$ 。

表 3 不同样品不同细胞数量的峰电位重现性实验

Table 3 Reproducibility of Leukocyte peak potential of different sample with unequal number of cells

序号 No.	细胞编号 Sample	膜上细胞数 Cell numbers on membrane ($\times 10^4$ cells)	峰电位 mV
1	L1	5.2	620
2	L2	13.4	626
3	L3	37.8	632
4	L4	3.8	634
5	L5	35.5	626
6	L6	29.0	637

电位扫描速率 $v = 100 \text{ mV/s}$, 变异系数 $CV = 0.997\%$ 。

随着电位扫描速率 v 的增加而增大, 而粒细胞则无此现象。说明健康人淋巴细胞在平面热解石墨电极上的响应接近于一个不可逆的过程, 而粒细胞在平面热解石墨电极上的响应则显然具有部分可逆的性质^[8], 淋巴细胞和粒细胞同为人体的免疫活性细胞, 但由于粒细胞具备吞噬及变形活动能力^[9], 估计它在正常生理状态下具有较淋巴细胞更旺盛的代谢水平, 故能在平面热解石墨电极上有不同的响应。另外, 响应的差异也可能与两种细胞具备不同的质粒结构有关, 粒细胞含较多的细胞器, 质膜结构丰富; 而淋巴细胞基本无细胞器, 因而导致细胞与电极电子传递的不一致。因此, 相同电位扫描速率下氧化峰电位 E_p 的差异, 还原回扫有无相对应的还原峰, 以及不同电位扫描速率下氧化峰电位的改变情况等指标, 可以帮助我们准确地识别健康人淋巴细胞与粒细胞。

2.4 健康人白细胞的计量

为探讨使用本传感器系统计量细胞数的可能性, 进行了细胞阻留膜上细胞数与 e_p (峰电流的半微分) 线性关系的实验 (见图 4):

结果表明, 当膜上细胞数在 $(1.8 \sim 18.1) \times 10^4$ cells 范围内, e_p 与膜上细胞数的相关系数为

0.9888, 两者之间存在极其良好的线性相关关系。

表 4 是用本传感器系统, 利用图 4 的标准曲线对白细胞的样品计量的结果及与显微镜下计数的比较

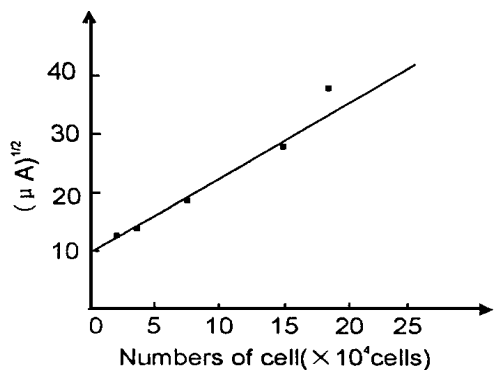


图 4 半微分峰电流与阻留膜上细胞数的关系

Fig. 4 Correlation between semi-difference peak current and the numbers of cell blocking on trap membrane

表 4 白细胞传感器计数与显微镜下计数的比较

Table 4 Comparison of leukocyte counting with microscope and biosensor

序号 No.	显微镜下计数 Counting with microscope ($\times 10^4$ cells/mL)	传感器法计数 Counting with biosensor ($\times 10^4$ cells/mL)	变异系数 CV (%)
1	5.60	5.61	0.13
2	1.90	2.03	4.68
3	11.5	12.0	3.01
4	8.60	8.77	1.38
5	3.00	3.23	5.22
6	17.5	15.9	6.77
7	2.80	3.11	7.42
8	7.60	7.55	0.47
9	4.80	4.85	0.73

结果表明, 传感器法计量白细胞数, 与显微镜下

计数法有极好的一致性。

3 结语

对健康人白细胞在平面热解石墨电极上的半微分循环伏安响应的初步研究, 已证实作者研制的伏安型生物传感器系统可以成功地识别健康人淋巴细胞和粒细胞, 并能对健康人白细胞进行计量。进一步的研究, 将是深入探索细胞的响应机理, 进而拓展到正常与异常 (癌肿) 细胞的识别

参考文献

- Matsunaga T. Appl Environ Microbiol, 1979, 37: 117~121.
- Nishikawa. Appl Environ Microbiol, 1982, 43: 814~818.
- Xu Cunxiang, Zhou Yuming, Li Gan. Proc state key laboratories of Transducer Technology, Academia Sinica, 1991, 107~111.
- 相泽益男. 高分子论文集. 1984, 41 (4): 257~260.
- Matsunaga T. Anal Chem, 1984, 56: 798~801.
- Matsunaga T. Anal Chem, 1989, 61: 2471~2474.
- Matsunaga T. Anal Environ Microbiol, 1985, 50: 238~242.
- Anson F. 电化学与电分析化学. 黄蔚曾等译. 北京: 北京大学出版社, 1983.
- Junqueira L C. Basic Histology. 3rd edition. Lange Medical Publications, 1980.
- David. "Biochemistry-The Chemical Reaction of Living Cells", Acaggenic Press, London INC, 1980.
- De Robertics. Cell and Molecular Biology. 7th edition. Saunders College Press, 1980.
- G Milazzo. 生物电化学—生物氧化还原反应. 肖科译. 天津: 天津科技出版社, 1990.

(责任编辑: 邓大玉)

丙肝感染的新线索

丙肝病毒 (HCV) 通过物理途径感染了世界上 3% 左右的人口。只有搞清它的感染机制, 人们才能开发出对症的疫苗和治疗方法。但是人们一直无法在试管内成功地使细胞感染 HCV, 因而研究病毒在生存周期中的活动也十分困难。最近, 意大利科学家 Pileri 等寻找到丙肝感染的一些新线索。他们发现细胞表面蛋白质 CD81 在病毒感染寄主细胞的过程中起到非常重要的中介作用。Pileri 等对相关病理过程的详细阐述, 见 1998 年 10 月 30 日出版的《科学》。

(摘自《中国科学报》1998 年 11 月 4 日第 2 版)