

再生丝素固定的酶标免疫传感器的研究

李 伟^{1*} 李幼荣² 潘 宁¹

¹(扬州大学生物科学与技术学院 扬州 225009)

²(扬州大学理学院化学系 扬州 225009)

摘 要 所研究的酶标免疫传感器是采用再生丝素将待测抗原(兔 IgG)固定在石墨电极表面,选用抗体(山羊抗兔 IgG-HRP)与其识别结合。利用 H_2O_2 将抗原抗体结合的电位响应信号放大采用直接电位法检测 IgG 的浓度。该传感器测定 IgG 的最低浓度可达 1.2×10^{-10} mol/L,标准曲线的线性范围在 $4.1 \times 10^{-7} \sim 1.2 \times 10^{-10}$ mol/L,回归方程为: $\Delta E = -1049 + 721g[IgG]$,响应时间为 15s。通过电泳的方法加速抗原抗体的识别结合,反应时间由原来的 90min 缩短到 30min。这种以固定化抗原结合酶标抗体量的多少作为检测抗原标准的新型酶标免疫传感器,在临床检测、环境监测、HLA 个人身份鉴定等领域都有着广阔的应用前景。

关键词 再生丝素, IgG, 酶标免疫传感器, 电泳

中图分类号 Q554, O657.12 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2001)06-0639-04

酶标免疫传感器是近几年发展起来的一项新技术,它是将酶电极^[1]的化学放大作用与免疫电极的特异性相结合,兼得二者优点,具有免疫反应的特异性和电化学分析的灵敏性。本文研究的酶标免疫传感器是利用再生丝素将抗原(兔 IgG)固定在石墨电极表面,选用抗体(山羊抗兔 IgG-HRP),通过电泳,加速抗原抗体的识别结合。经洗涤后,加入定量的过氧化氢^[2](H_2O_2),这时,随抗体附着在电极上的辣根过氧化物酶 HRP 就会氧化 H_2O_2 ,产生与兔 IgG 浓度呈正比的电位差值,直接测量电极的电位响应信号,从而达到检测 IgG 含量的目的。

再生丝素蛋白在固定 IgG 过程中,丝素蛋白从亚稳态的 α -螺旋结构转变为稳定的 β -折叠结构, IgG 被包埋在其中,无需任何交联剂,制备和操作简便。经电泳,恒流 0.5mA,大大缩短了抗原抗体间的识别结合过程,反应时间由原来的 90min^[3] 缩短为 30min,这在国内外鲜有报道。

这种利用酶的化学放大作用和电泳缩短反应时间的酶标免疫传感器灵敏度较高,而且设备简单,响应快速,还可以微型化,不仅可用于临床检测、生物医学研究等^[4] 领域,如测定各种抗体、抗原、半抗原及能够进行免疫反应的多种生物活性物质(例如激

素、蛋白质、药物、毒物等)^[5],而且还有望应用于动植物疾病检测、环境监测、HLA 个人身份鉴定等领域,有着广阔的应用前景。

1 材料和方法

1.1 主要仪器与试剂

PHS-3B 精密 pH 计、85-2 型恒温磁力搅拌器(上海司乐仪器厂)、电热恒温水浴锅(上海跃进医疗器械厂)、SWDY-3LB 型电泳仪(南京大学科教仪器厂)、光谱纯石墨电极棒、232 型饱和甘汞电极(江苏电分析仪器厂)。抗原:兔血清(IgG 12.4mg/mL,分子量为 150kD);抗体:山羊抗兔 IgG-HRP(华美生物工程公司)、蚕丝(蚕茧)、LiBr、NaOH-KH₂PO₄ 缓冲液(PBS)、 H_2O_2 、再生丝素。再生丝素溶液^[6]: 0.15g 蚕丝溶解于 2mL 9.3mol/L 的 LiBr 溶液中,用去离子水透析,即得所需溶液。实验用水为二次重蒸水。

1.2 酶免疫传感器的制备

1.2.1 酶免疫传感器的预处理: 选用 20mm × 46mm 的光谱纯石墨棒一支,一端作涂膜,检测电位响应,另一端作为信号输出。将石墨棒嵌入与其相匹配的玻璃管内,用石蜡封固。滴入几滴汞,以使信号输出端接触良好。外截面经细砂纸磨平后,再用 200 目

收稿日期:2001-04-16,修回日期:2001-08-12。

基金项目:扬州大学科研创新基金。

* 通讯作者。 Tel:86-514-7979202; Fax:86-514-7351747; E-mail: blzhou@mail.yzu.edu

的金相砂纸细磨,使石墨电极横截面保持一个良好和一致的接触界面。用蒸馏水清洗后,晾干待用。

1.2.2 抗原的固定:采用再生丝素固定抗原。将 2mg 兔血清溶于 200 μ L pH7.6 的 NaOH-KH₂PO₄ 缓冲液中制成抗原溶液,将此溶液与丝素溶液等体积混合后,滴于酶标免疫传感器表面,在室温下自然晾干成膜。可浸入 pH7.6 缓冲液中,保存在 4℃ 冰箱中待用。

1.3 抗原抗体的识别结合

抗体分子上抗原结合部位具有与抗原形状相当的分子空间,其中的抗体结合点和抗原决定簇足够接近时,借助离子键、氢键和范德华力的作用将抗体与其抗原结合在一起形成抗体-抗原复合物。固定化抗体或抗原在相应的抗原或抗体结合时,自身的立体结构和物性发生变化,但这个变化是比较小的。本实验抗体与固定在酶标免疫传感器上的抗原结合,37℃ 恒温反应 90min。

1.4 洗涤

将结合了抗体的酶标免疫传感器浸入 pH7.4 PBS 缓冲液中,均匀搅拌 15min,洗去非特异性结合的酶标抗体,中间换液 2 次,再用蒸馏水洗去传感器表面的无机离子,待用。

1.5 酶标免疫传感器的测试方法

本实验采用直接电位测定法检测抗原浓度。将酶标免疫传感器作为工作电极浸入盛有 60mL 0.1% ~ 2% 不同浓度 H₂O₂^[7] 的烧杯中,以饱和甘汞电极作为参比电极,在均匀搅拌下,室温测定电位值。当浸入酶标免疫传感器时,记录初始电位值,紧接着记录 1s、4s 后的电位值,然后每 5s 记录 1 次,直至电位值稳定。

1.6 电泳对抗原抗体结合的影响

由于抗原(兔 IgG)是球蛋白,等电点为 pH6 ~ 7,在 pH8.6 的巴比妥缓冲液中所带的电荷较少,其分子量也较大,所以电泳速度较为缓慢,并在电渗作用下,由正极向负极移动。如将固定有抗原的酶标免疫传感器接负极,另插一个接正极的铂电极作为辅助电极,形成一个回路,则抗体在溶液中向负极泳动。因抗原已被固定,不易解离,则抗体与固定化的抗原快速识别结合。由于在电场中限制了抗体(或抗原)的自由扩散,从而提高了试验的灵敏度,且能在较短时间内检测抗原浓度。

本实验采用 pH8.6, $c = 0.05$ 的双浓度巴比妥缓冲液作为碱性溶液。将山羊抗兔 IgG-HRP 与双浓度巴比妥缓冲液以及蒸馏水以体积比为 2:2:1 进行稀

释,加入 20mL 的安培瓶中。用电泳仪恒流 0.5mA,电泳 30min。

2 结 果

2.1 电位响应-时间曲线

将兔血清以每 mL 含 12.4mg IgG,分子量以 150kD 折算,用再生丝素 pH7.6 PBS 混合溶液稀释成 10⁻⁷、10⁻⁸、10⁻⁹、10⁻¹⁰ mol/L,分别在酶标免疫传感器上涂膜,与 1% H₂O₂ 反应。

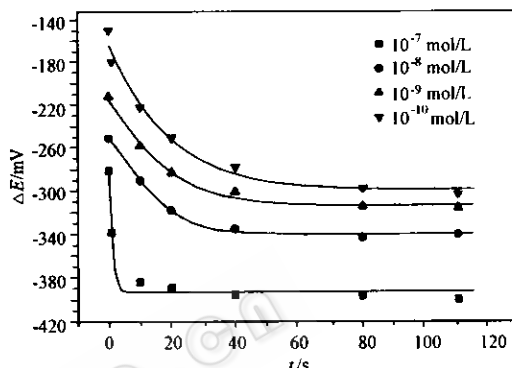


图 1 电位响应-时间曲线

Fig.1 The relationship curve of electrode potential and interaction time

如图 1 所示,实验数据表明:测得的电位值随时间而迅速降低,并在 10s ~ 40s 内达到稳定,且随着抗原(兔 IgG)浓度的减少,其响应时间有增加的趋势。

2.2 电位值响应与浓度对数的标准曲线

分别将 10⁻⁷、10⁻⁸、10⁻⁹、10⁻¹⁰ mol/L 的抗原(兔 IgG)涂在酶标免疫传感器上,测定其电位值,制成标准曲线,如图 2 所示。

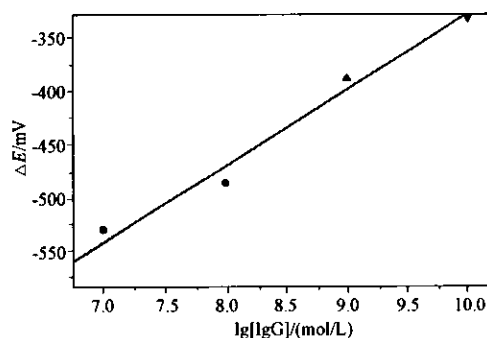


图 2 电位值响应与浓度对数的标准曲线

Fig.2 The standard curve of the electrode potential and the minus logarithm of the concentration of immobilized antigen

测定的线性范围为: $4.1 \times 10^{-7} \sim 1.2 \times 10^{-10}$ mol/L;

回归方程为: $\Delta E = -1049 + 72 \lg [\text{IgG}]$;

最低检测浓度为: 1.2×10^{-10} mol/L

2.3 电泳对抗原抗体结合的影响

本实验用 10^{-7} mol/L 抗原(兔 IgG)涂膜,分别在恒流 2mA、1mA、0.5mA 30min 后测电位值,如图 3 所示。

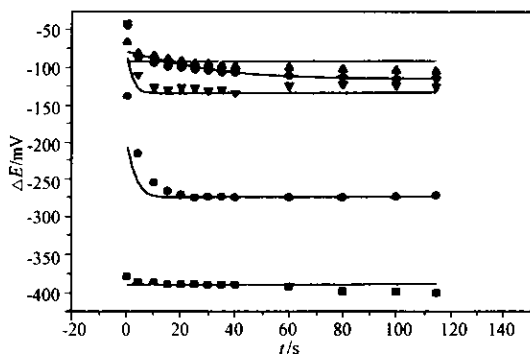


图 3 电泳对抗原抗体结合的影响曲线

Fig.3 The relationship curve of electrophoresis and interaction time

- No antibody; ▲ 10^{-7} mol/L Steady juice 2mA 30min;
- No electrophoresis; ▼ 10^{-7} mol/L Steady juice 1mA 30min;
- 10^{-7} mol/L 90min; ◆ 10^{-7} mol/L Steady juice 0.5mA 30min

实验表明:恒流 1mA 30min 与未电泳 90min 的电位值响应-时间曲线一致,响应时间均为 10s。而恒流 0.5mA 30min 后,测得的响应时间约为 30s。恒流 2mA 30min 的曲线较平直,与未涂膜时测得的曲线较一致,可能是因为 2mA 电流值较大,电解了水,破坏了抗原、抗体-HRP 的空间结构,使其活性降低,抗原抗体结合能力下降,附着在酶标免疫传感器表面的 HRP 量减少,电位响应较差。

2.4 H_2O_2 浓度对测试的影响

本实验采用了 10^{-8} mol/L 抗原(兔 IgG)分别在 0.1% H_2O_2 、0.5% H_2O_2 、1% H_2O_2 、2% H_2O_2 4 种不同浓度下测定电位的响应值,如图 4 所示。

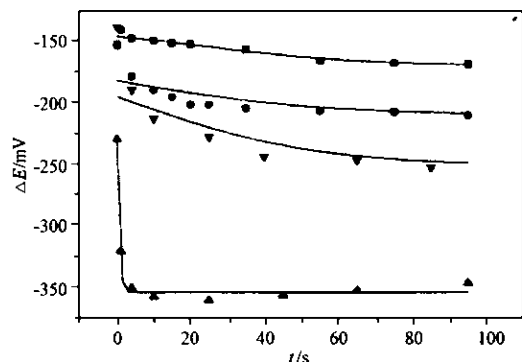


图 4 H_2O_2 浓度对测试的影响曲线

Fig.4 The relationship curve of the concentration of H_2O_2 and the electrode potential

- 10^{-8} mol/L 0.1% H_2O_2 ; ▲ 10^{-8} mol/L 1% H_2O_2
- 10^{-8} mol/L 0.5% H_2O_2 ; ▼ 10^{-8} mol/L 2% H_2O_2

实验表明:随着 H_2O_2 浓度的升高,响应时间响应缩短;当浓度为 0.1% 时,响应时间约为 60s;当浓度为 0.5% 时,响应时间约为 40s;当浓度为 1% 时,响应时间较短,约为 6s。当浓度为 2% 时,其响应时间并不是最短的,但其电位值总是介于 0.5% 与 1% H_2O_2 的响应曲线之间,可能是因为底物 H_2O_2 浓度过高,反馈抑制了 HRP 酶的活性。

2.5 测试的重现性

本实验采用 10^{-7} mol/L 抗原(兔 IgG)做重复性试验。24h 以后测得的电位响应曲线与原先响应曲线基本一致,其响应时间均为 10s,稳定后电位值仅相差 5mV,这表明酶标免疫传感器的重现性和稳定性良好,如图 5 所示。

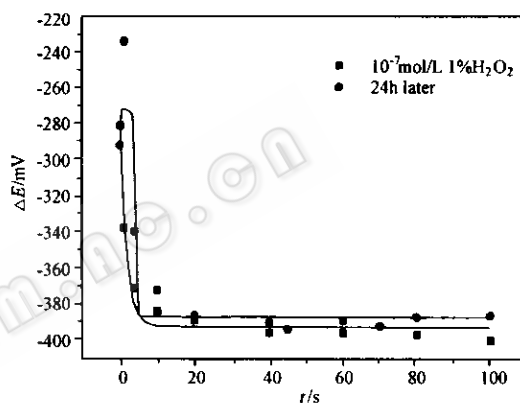


图 5 重现性

Fig.5 The reproducibility curve

2.6 干扰试验

以 3×10^{10} 个/mL 细菌浓度的鸡白痢、鸡伤寒、鼠伤寒沙门氏菌以及猪霍乱沙门氏菌的 O_7 单抗(1:4 稀释)作为干扰物质,进行干扰对比实验,结果均不干扰测定。如鼠伤寒干扰试验的电位响应曲线与未涂膜的曲线基本平行,稳定后电位值仅相差 1mV,表明不干扰测定。

3 讨论

本实验采用兔抗原(IgG)固定在酶免疫传感器表面,用山羊抗兔 IgG-HRP 检测。也可将一对能发生特异性免疫识别的免疫分子中的任何一方固定化,另一方只需作酶标记,即可进行检测。

为了获得高灵敏度和高重现性的酶标免疫传感器,必须将抗原尽可能多地固定在酶标免疫传感器上,并保持其牢固性。用电泳方法加速抗原抗体结合时,注意电流的大小,以免电解水,破坏了抗原、抗体及酶的空间结构。电流一般保持在 0.5mA 左右,

恒流 30min。洗涤时要充分洗去非特异性结合的抗体,仅留下与抗原浓度对应的抗体。选择 H_2O_2 浓度应适宜,我们选用 1% H_2O_2 。抗原浓度在 10^{-7} mol/L 时所测得的电位响应曲线最佳,响应时间约为 15s。

酶标免疫传感器,通过抗原抗体识别,特异性结合,有高精度性和高精密度。它有两个主要优点:一是敏感度高,检测灵敏度达到 $1.2 \times 10^{-10} \text{ mol/L}$;二是检测速度快,抗原抗体结合仅需 30min。酶标免疫传感器在临床检测、生物医学研究、动物植疾病的检测、食品安全、环境监测、HLA 个人身份鉴定等领域中有较大的应用价值。

REFERENCES(参考文献)

- [1] JIANG Y H(姜远海),HUO J W(霍纪文) *et al.* *Medical Sectors*, Bios Scientific Publishers limited,1999
- [2] Deasy B,Dempsey E,Smyth M R *et al.* Development of an antibody-based biosensor for determination of 7-hydroxy-coumarin (umbelliferone) using horseradish peroxidase labeled anti-7-hydroxycoumarin antibody. *Anal Chim Acta*,1994,(294):291 ~ 297
- [3] LIU B Q(刘宝全),SUN H L(孙慧兰),LI J B(李俊宝) *et al.* Guide to the Experiment of Veterinary Immunology,Shanghai scientific and technological Publishers limited,2000
- [4] LI X S(李新生),BAI J(白静) *et al.* The Advance of Research for Technique of Fusing Physiological Information, *Journal of Biomedical Engineering*(生物医学工程学杂志),2000,17(4):464 ~ 468
- [5] PENG T Z(彭图治),ZHU F M(祝方猛),YANG L J(杨丽菊) *et al.* Investigations of Silk Fibroin Electrochemical Immunosensor and Its Application in Clinical Analysis *Journal of Applied Sciences*(应用科学学报),1999,17(1):15 ~ 17
- [6] CHENG Q(程琼),XI L L(习玲玲),SHI Q Z(施清照) *et al.* Biosensor of Glucose Dehydrogenase Immobilized by Regenerated Silk Fibroin. *Journal of Zhejiang University (Nature Science)*(浙江大学学报自然科学版),1998,25(4):64 ~ 66
- [7] YAO B(姚赞),ZHAO Y B(赵益斌),WEN M L(文孟良) *et al.* Antibody and its Application in Immunosensor. *Journal of YunNan Chemistry*(云南化工),1999,2(1):27 ~ 30

Study on Enzyme Immunosensor Immobilized by Regenerated Silk Fibroin

LI Wei¹* LI You-Rong² PAN Ning¹

¹(Institute of Bioscience and Biotechnology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

²(Institute of Science and Technology, Department of Chemistry, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract The author studies the enzyme immunosensor made up of graphite electrode and protein film of regenerated silk fibroin which is employed to immobilized antigen (rabbit IgG). IgG will be recognized and combined by antibody (goat-anti-rabbit IgG-HRP). After enlarging the signal of the combination of antigen and antibody by H_2O_2 , the concentration of IgG is able to be measured by testing the electrode potential directly. The Enzyme Immunosensor is sensitive when measuring IgG and the detection limit of $1.2 \times 10^{-10} \text{ mol/L}$ is found. It shows linear response over the concentration range of $4.1 \times 10^{-7} \sim 1.2 \times 10^{-10} \text{ mol/L}$. Electrophoresis cuts down the time of antibody-antigen interaction from 90min to 30min. The response time is 15s. Enzyme immunosensor with better stability and higher sensitivity can be used extensively in clinical diagnosis, medical and environmental studies, HLA molecular diagnosis and so on.

Key words regenerated silk fibroin, IgG, enzyme immunosensor, electrophoresis

Received: April 16, 2001

The work was supported by grant from Yangzhou University Scientific Development.

* Corresponding author. Tel: 86-514-7979202; Fax: 86-514-7351747; E-mail: blzhou@mail.yzu.edu