

基于酶催化沉积质量放大的压电免疫传感器的研究

符 婷, 王 桦, 沈国励, 俞汝勤

(湖南大学化学化工学院, 化学/生物传感与计量学国家重点实验室, 长沙 410082)

摘要 提出了一种酶催化沉积质量放大的高灵敏压电免疫传感器. 采用1,6-二巯基己烷在石英晶振上自组装一单分子层, 再通过另一端巯基连接胶体金, 利用胶体金的高比表面积和强吸附作用力增加抗 IgG 抗体的固定量, 同时借助胶体金优良的生物亲和性保持抗 IgG 抗体的活性. 在 H_2O_2 存在下, 通过标记在抗人 IgG 抗体上的 HRP 酶催化底物 DAB(3,3'-联苯二胺), 反应中生成的不溶性产物沉积到石英晶振的 Au 电极表面, 达到质量放大的目的. 结果表明, 检测人 IgG 在 16 ng/mL ~ 100 μ g/mL 范围内有很好的线性关系, 检测下限为 10 ng/mL, 在用于实际试样的回收率测定中, 结果良好.

关键词 酶催化放大; 胶体金; 1,6-二巯基自组装; 压电免疫传感器

中图分类号 O657 **文献标识码** A **文章编号** 0251-0790(2006)06-1032-04

近年来, 已有许多致力于信号放大免疫传感器的研制报道^[1~3], 其中应用较多的是通过阻抗信号的变化来检测抗原(抗体)或 DNA 的含量. 这些方法大多通过在生物分子上连接的酶, 在一定条件下催化某一反应底物, 产生一种非导电性物质, 沉积于电极表面, 使电极表面的阻抗增加, 达到放大信号的目的. Willner 等^[2,4,5]曾采用法拉第阻抗及计时电流的方法监测了电极表面沉积不溶物时氧化还原电对的电子传导, 及引起氧化还原电流的减小或电极表面阻抗增加的情况. 在上述研究中, 常用的反应底物包括 4-氯-1-萘酚^[1]和 3,3',5,5'-四甲基联苯胺等^[6,7]. 本文首次采用 DAB(3,3'-联苯二胺)作为 HRP 酶催化反应的底物, 研制成功一种新的酶催化沉积质量放大的压电免疫传感器, 显著改善了检测的灵敏度, 在实际试样回收率试验中取得良好结果.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

牛血清白蛋白和 HRP 标记抗人 IgG 购自北京鼎国生物试剂公司, DAB(3,3'-联苯二胺)购自美国 Sigma 公司, 抗人 IgG 抗体和人 IgG 购自上海生物制品研究所, 1,6-二巯基己烷购自 Fluka 公司, 氯金酸和柠檬酸钠均购自中国医药集团上海化学试剂有限公司, 实验中均使用二次水.

先用 0.5 mol/L Tris-HCl(pH = 7.6)缓冲液溶解 DAB, 再用二次水稀释, 加入适量 H_2O_2 , 得到含有 0.5 mg/mL DAB 及质量分数为 0.03% 的 H_2O_2 底物溶液.

AT-切型石英晶振, 9 MHz, 双面镀金, 一面用“O”型橡胶环和塑料薄片封闭形成空气室, 用于液相测定. 采用 QCA 922 分析仪(Seiko EG & G Co. Ltd. 日本)记录实验中的频率变化. 实验中采用 3 mL 的自制反应池, 缓冲液为 pH = 7.2 的 PBS.

1.2 实验过程

1.2.1 胶体金的制备 参照文献[8]方法制备胶体金. $HAuCl_4$ 溶液和柠檬酸三钠溶液在使用前以 0.45 μ m 孔径的滤膜过滤, 取 100 mL 质量分数为 0.01% 的 $HAuCl_4$ 溶液于蒸馏瓶中, 加热煮沸, 在搅拌下快速加入 4 mL 质量分数为 1% 的柠檬酸三钠溶液, 搅拌煮沸 30 min, 至出现橙红色后停止加热,

收稿日期: 2005-09-23.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 20435010, 20205005 和 20375012)资助.

联系人简介: 沈国励(1938 年出生), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事化学与生物传感技术的研究. E-mail: glshen@hnu.cn

继续搅拌10 min, 即制得平均粒径为15 nm的胶体金. 将制备的胶体金置于棕色瓶中, 于4 °C下保存备用.

1.2.2 晶振的预处理 石英晶振用新配制的 Piranha 液 $[V(H_2SO_4):V(H_2O_2) = 7:3^{[9]}]$ 洗涤3次, 每次3 min, 以清洁晶振表面, 然后用二次水洗净, 于 N_2 气下干燥备用.

1.2.3 传感器的制备 传感器的制备过程如图1所示. 将预处理好的晶振浸泡在2.5 mmol/L的1,6-二巯基己烷溶液中, 室温下放置1 h, 即制得自组装单层膜. 再分别用PBS(pH = 7.2)和二次水洗净, 干燥, 然后置于适量胶体金溶液中于室温下避光放置5 h. 取出后再用PBS(pH = 7.2)和二次水洗净, 干燥. 然后在修饰了胶体金的晶振上滴加25 μ L效价比为1:10的抗人IgG抗体, 室温下放置1 h. 最后采用10 mg/mL BSA 封闭金电极上未结合抗体的空白位点.

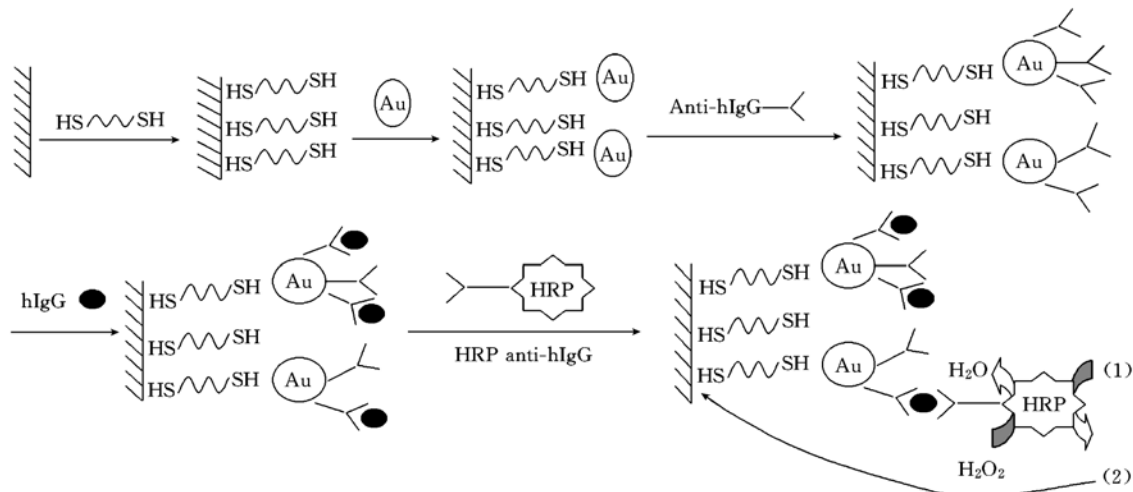


Fig. 1 Schematic diagram of amplified immunoassay of hIgG

(1) DAB; (2) DAB deposition.

1.2.4 免疫分析过程 测定过程均在3 mL的自制反应池中进行, 缓冲液为pH = 7.2的PBS. 将修饰了抗人IgG抗体的晶振分别与不同浓度的人IgG反应后, 用PBS(pH = 7.2)和二次水洗净, 然后在晶振上滴加25 μ L 0.2 mg/mL HRP标记的抗人IgG抗体, 于36.5 °C下反应0.5 h. 再经PBS和二次水洗净后置于DAB溶液中, 在36.5 °C下反应20 min后取出, 洗净. 采用QCA922分析仪监测其响应的频率信号.

2 结果与讨论

2.1 抗体的固定及酶催化反应过程

传感界面的反应过程示于图1, 实验中采用含双巯基的1,6-二巯基己烷, 先在晶振上形成均一、稳定且有序的巯基自组装单层膜, 再浸泡于胶体金溶液中, 形成了修饰胶体金的传感界面^[10]. 由于胶体金具有比表面积大、吸附力强和生物分子亲和性高等优点, 可用此提高抗体的固定量, 并采用夹心法和HRP酶催化沉积法放大传感器的响应信号.

图2为免疫传感界面反应的频率变化图. 修饰了胶体金的晶振与抗体结合后频率下降了 (380 ± 24.5) Hz(图2点a处), 与100 μ g/mL人IgG抗原发生免疫反应后, 频率变化很小(图2点b处), 而在HRP和 H_2O_2 存在下, DAB被氧化生成不溶物沉积到晶振表面时, 引起频率的变化值增加到

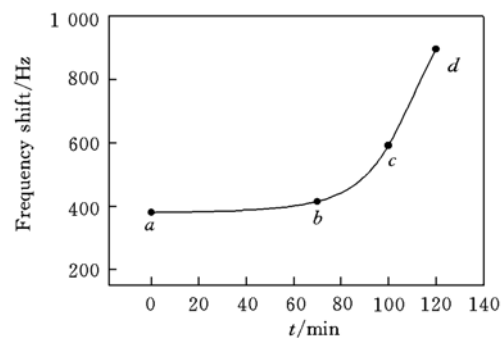


Fig. 2 Frequency changes corresponding to colloid Au modified QCM reacted with anti-hIgG(a), hIgG(b), HRP labeled anti-hIgG(c) and DAB(d)

(515 ± 14.2) Hz(图2点d处), 信号放大达10余倍. 采用法拉第阻抗对实验过程进行了表征(图3), 在沉积了不溶物后, 电极阻抗有了明显提高, 表明传感器的灵敏度有了很大的改进.

考察了胶体金的结合时间对抗体固定量的影响. 随着胶体金的结合时间的增加, 抗体的固定量也随之增加, 至5 h时, 抗体的固定量达到最大, 然后呈逐渐减少的趋势. 这可能是因为在胶体金的结合量增加的同时产生部分团聚而造成空间位阻增大, 使抗体的固定量反而减小的结果.

实验还考察了抗体稀释度对抗体固定量的影响. 结果表明, 当抗体效价为1:10时, 抗体的固定量达到最大. 当抗体浓度大于1:10时, 结合到胶体金上的抗体量反而减少, 这可能是由于胶体金的结合位点有限, 浓度升高时, 固定化速度加快, 使固定后的抗体排列无序, 引起空间位阻增加, 反而不利于抗体的固定.

2.2 实验条件的优化

H_2O_2 的质量分数及沉积产物的时间对实验结果有较大影响. 随着 H_2O_2 的浓度的升高或沉积产物时间的延长, 频率变化值也随着增高, 此结果与文献[11]报道的结果一致. 但考虑到 H_2O_2 的质量分数过高时背景值也将随之增加, 此外, 20 min的沉积产物时间已有足够高的频率响应值. 因此, 实验中选定的 H_2O_2 质量分数为0.03%, 沉积产物时间为20 min. 此外, 还考察了DAB的浓度对实验的影响(数据未列出), 随着DAB的浓度升高, 频率变化值逐渐升高, 至0.5 mg/mL时基本不变, 实验中选取DAB的质量浓度为0.5 mg/mL.

2.3 工作曲线及检测限

检测了一系列不同浓度的人IgG的频率响应值与浓度的关系(图4), 图4中数据均为3次测量的平均结果. 由图4可见, 在16 ng/mL ~ 100 μ g/mL范围内, 频率的变化值与人IgG呈很好的线性关系,

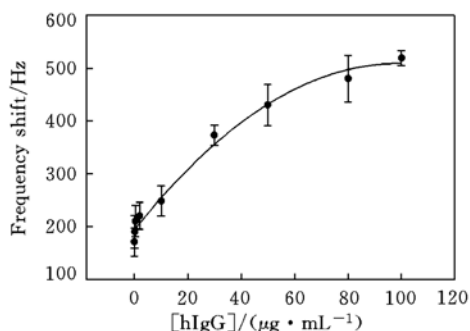


Fig. 4 Calibration curve of the assay for hIgG

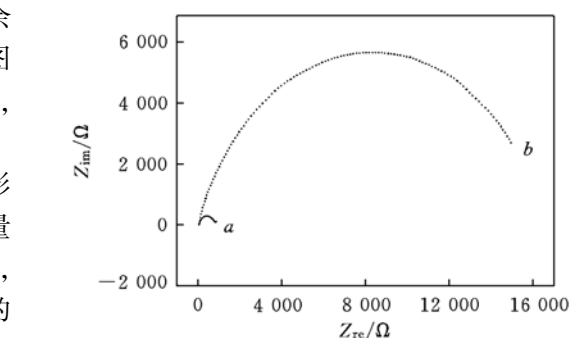


Fig. 3 The impedance plots before(a) and after(b) amplified operation

线性方程为 $y = 4.63x + 196.90$, 相关系数为0.9960, 根据 3σ 规则计算出检测下限为10 ng/mL. 与文献[10,12]报道的传统不放大的传感器进行了比较, 此传感器检测下限较低, 灵敏度较高, 线性范围也很宽.

为考察该传感器对样品中人IgG浓度的检测, 做了回收率实验. 将不同浓度的人IgG加入到实际血清中(血浆蛋白成分参考血清), 记录了晶振的频率响应值(表1), 得到的回收率为92.1% ~ 112%.

Table 1 Measured results from the samples(μ g/mL)*

Sample No.	Add	Found \pm SD	Recovery (%)
1	45.500	41.900 ± 12.200	92.1
2	0.688	0.771 ± 0.089	112.0
3	0.138	0.132 ± 0.023	95.6

* The measured results were the mean data calculated from three measurements.

参 考 文 献

- [1] Patolsky F., Kate E., Willner I. *et al.*. Langmuir[J], 1999, **15**: 3703—3706
- [2] Patolsky F., Zayats M., Willner I. *et al.*. Anal. Chem. [J], 1999, **71**: 3171—3180
- [3] Yoon H. C., Yang H., Kim Y. T. *et al.*. Analyst[J], 2002, **127**: 1082—1087
- [4] Alfonta L., Bardea A., Khersonsky O. *et al.*. Biosens. Bioelectron. [J], 2001, **16**: 675—687

- [5] Katz E. , Alfonta L. , Willner I. *et al.* . Sens. Actuators. B[J], 2001, **76**: 134—141
- [6] He Z. H. , Jin W. R. . Anal. Biochem. [J], 2003, **313**: 34—40
- [7] ZHAO Jin-Fu(赵金富), WANG Yong-Cheng(王永成), MI Jian-Qiu(米健秋) *et al.* . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2004, **25**(6): 1019—1022
- [8] Graber K. C. , Freeman R. G. , Hommer M. B. *et al.* . Anal. Chem. [J], 1995, **67**: 735—743
- [9] Colin D. B. , Joe E. , George M. W. *et al.* . J. Am. Chem. Soc. [J], 1989, **111**: 7155—7164
- [10] Wang M. J. , Wang L. Y. , Li J. H. *et al.* . Biosens. Bioelectron. [J], 2004, **19**: 575—582
- [11] Alfonta L. , Willner I. . Anal. Chem. [J], 2001, **73**: 5287—5295
- [12] LI Ji-Shan(李继山), WU Zhao-Yang(吴朝阳), SHEN Guo-Li(沈国励) *et al.* . Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2003, **24**(4): 624—626

An Amplified Piezoelectric Immunosensor Based on Amplification of Enzyme-catalyzed Precipitation Mass

FU Ting, WANG Hua, SHEN Guo-Li* , YU Ru-Qin

(State Key Laboratory for Chemo/Biosensing and Chemometrics, College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan University, Changsha 410082, China)

Abstract In this paper, an amplified immunosensor with highly sensitivity has been proposed based on precipitation of an insoluble product on functionalized electrode. Anti-hIgG was immobilized onto the surface of gold electrode modified with 1,6-hexanedithiol and colloidal Au interface. It was proved that the amount of immobilized antibody and the immunoactivity of bound antibodies could be well improved by colloidal Au. HRP labeled antibody reacted with antigen, then HRP biocatalyzed DAB (3,3'-diaminobenzidine) in the presence of H₂O₂, resulting in an insoluble product on the electrode surface, to achieve an obviously decreased frequency. Comparing with the direct detection of antigens, the immunosensor with the proposed amplified procedure shows improved sensitivity due to the significantly extended detection range. Analytical results indicate that the developed amplified procedure is a promising alternative for biorecognition element on the electrode surface showing an improved performance in terms of the magnitude of the response and sensitivity. The proposed immunosensor in optimal conditions has a linear range of 16 ng/mL—100 μg/mL for hIgG detection with a detection limit of 10 ng/mL. The immunosensor can be used to quantitatively determine hIgG in the sample of human serum.

Keywords Enzyme-biocatalyzed amplification; Colloidal Au; 1,6-Hexanedithiol self-assemble; Piezoelectric immunosensor

(Ed. : A, G)