

光学免疫传感器中芯片的制备

宋保栋¹, 施汉昌¹, 何苗¹, 张凡¹, 郭彬彬²

(1 清华大学 环境科学与工程系, 北京 100084; 2 中国矿业大学, 北京 100083)

摘要: 为满足光学免疫传感器在环境监测和食品卫生检测领域中应用的要求, 研究一种免疫芯片制备方法, 并用平面波导型荧光免疫传感器对免疫芯片的性能进行了评价。该方法可以将小分子物质固定到玻璃基底上。试验结果表明: 该芯片能够有效抑制蛋白质的非特异性吸附, 并对目标物质抗体的响应符合 Logistic 方程; 修饰基片的氨基葡聚糖的相对分子质量和氨基摩尔比都影响免疫芯片对抗体响应灵敏度; 平行测定 20 次的信号标准偏差小于 5%, 测定后芯片性能没有明显下降。

关键词: 环境监测; 免疫芯片; 光学免疫传感器; 氨基葡聚糖; 非特异性吸附

中图分类号: X 853

文献标识码: A

文章编号: 1000-0054(2007)06-0847-04

Optical immuno-sensors chip for environmental monitoring and food security detection

SONG Baodong¹, SHI Hanchang¹, HE Miao¹,
ZHANG Fan¹, GUO Binbin²

(1 Department of Environmental Science and Engineering,
Tsinghua University, Beijing 100084, China;
2 China University of Mining & Technology (Beijing),
Beijing 100083, China)

Abstract An optical immuno-sensor chip was developed for environmental monitoring and detection of food security. The planar waveguide fluorescence immuno-sensor was used to evaluate the chip performance. This chip immobilizes small amount of molecular substances onto a glass substrate. The test results show that chips prepared have little non-specific adsorption to proteins and the response to various antibody concentrations fitted the Logistic formula. The molecular mass and amino acid content of the amino-dextran used in the chip influences the chip sensitivity to antibodies. The signal standard deviation was less than 5% in 20 parallel tests. The chip performance did not deteriorate with time.

Key words: environmental monitoring; immuno-chip; optical immuno-sensors; amino-dextran; non-specific adsorption

基于亲和反应的免疫传感器技术在很多方面都有应用, 如研究蛋白质间的相互作用^[1], 测定人体血液中各种指标^[2], 并用来测定水环境中特定有机物浓度以及食品中的农药残留等^[3-4]。这些领域中目标物质相对分子质量较小(通常小于 1 000), 免疫检测中多采用间接竞争模式, 需要将待测目标物质固定到传感基片上。传感芯片的修饰和目标物质的固定技术是免疫传感器开发过程中的关键问题。

光学免疫传感器中芯片的基底材料是透明玻璃, 对玻璃基底的修饰通常采用硅烷化的方法^[5-6]; 但修饰后的基片对蛋白质的非特异性吸附较强, 且硅烷化试剂提供的活性基团有限, 不适合直接用于固定小分子物质。为了实现小分子物质的固定, 需要对基片进行进一步修饰, 将亲水性高分子聚合物引入到基片上^[7], 最常用的是葡聚糖, 葡聚糖能够很好地抑制蛋白质的非特异性吸附, 通过一定手段将活性基团引入到葡聚糖分子中^[8-9]。

本研究采用自备的氨基葡聚糖(amino-dextran, AMD)对玻璃基底进行修饰, 利用本课题组开发的平面波导型荧光免疫传感器评价免疫芯片的性能, 包括对蛋白质非特异性吸附抑制的效果, 以及对目标物质抗体特异性响应的能力, 考察葡聚糖相对分子质量和氨基摩尔比对芯片性能的影响, 最后评价芯片的稳定性。

1 平面波导型荧光免疫传感器

传感器系统如图 1 所示, 以 He-Ne 激光器作为激发光源, 功率为 5mW, 免疫芯片的尺寸为 60mm × 15mm × 2mm, 其中一个端面为抛光的斜面。激光经过斩波器后调制成一定的频率, 耦合进免疫芯

收稿日期: 2006-10-30

基金项目: 国家“八六三”高技术项目(2005AA 641040)

作者简介: 宋保栋(1980—), 男(汉), 北京, 博士研究生。

通讯联系人: 施汉昌, 教授, E-mail: hanchang@tsinghua.edu.cn

片后在其表面产生倏逝波。倏逝波透射深度内的荧光染料被激发产生荧光。荧光连同杂散光一起用多模光纤进行收集。杂散光用带通滤光片过滤掉。剩余的荧光进入硅光电二极管进行光电转换。电信号用锁相放大器测定。系统采用流动进样器进样,它包括2个蠕动泵、1个切换阀以及管路。所有的操作和数据采集都由计算机控制。

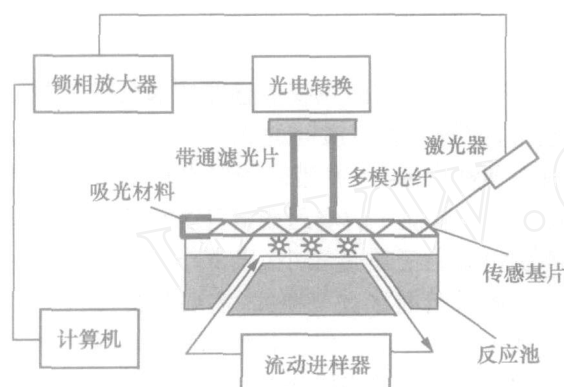


图1 传感器结构示意图

图2表示传感器系统在一个测定周期内的响应。主要包含4个过程:基线测定过程、免疫反应过程、信号测定过程和芯片活化过程。信号有效值可取信号最大值减去基线值,也可以取信号最大值后2min内的信号积分减去基线在2min内的积分。当芯片只需1次活化时,整个测定过程可以控制在20min以内。

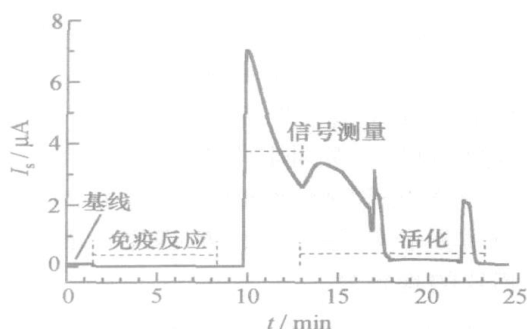


图2 传感器系统在一个测定周期的响应

2 试验部分

首先在传感表面镀上一层 SiO_2 ,经过氧化处理后含有一定量的羟基,可与硅烷化试剂发生反应,采用3-缩水甘油醚丙基三甲氧基硅烷(GOPTS);之后,含有氨基的亲水性高分子聚合物通过环氧基团偶联,目标污染物与高聚物共价结合,固定到传感芯片上。传感芯片的修饰与目标污染物固定的步骤见示意图3。

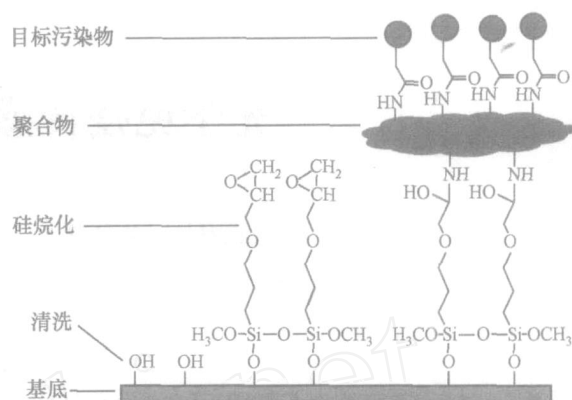


图3 传感芯片的修饰与固定步骤示意图

2.1 主要试剂与主要设备

3-缩水甘油醚丙基三甲氧基硅烷(GOPTS, Sigma), 二异丙基碳二亚胺(DIC, Aldrich), Cy5.5 荧光染料(Cy5.5 Amersham), 葡聚糖(Dextran, Pharmacia), 牛血清白蛋白(BSA, Sigma), 卵清蛋白(OVA, Sigma), 胃蛋白酶(Pepsin, Sigma), 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D, Sigma), 2,4-D 抗体由本课题组自主制备。镀有100nm左右厚度 SiO_2 的传感芯片。其他无机试剂从北京化学试剂公司购买。

氨基葡聚糖(Amino-Dextran AMD)由本课题组制备,以葡聚糖为原料,采用二步法——高碘酸钠氧化加氨基还原——进行合成。具体的实验步骤请参考文[8-9]。试验中制备了4种氨基葡聚糖,其中2号葡聚糖的氨基摩尔比 r 约为1号的1.5倍,如表1所示。

还有:等离子体镀膜机、本课题组自主开发的平面波导型荧光免疫分析仪等。

表1 自备的氨基葡聚糖的特征

编号	$M_r/1000$	$r(\text{氨基}/\text{单体})/\%$
AMD 40-1	40	1.6
AMD 40-2	40	2.5
AMD 70-1	70	1.3
AMD 70-2	70	2.3

2.2 免疫芯片制备

空白玻璃芯片用新配制的Piranha溶液($V(\text{H}_2\text{O}_2) \cdot V(\text{H}_2\text{SO}_4) = 2:3$)氧化1h,超纯水冲洗后 N_2 吹干;然后芯片上滴加纯GOPTS,为防止GOPTS与空气接触发生反应,将另一同样尺寸的芯片盖在上面,形成三明治结构,室温下在 N_2 环境中反应1h,之后用丙酮冲洗, N_2 吹干;硅烷化后的

芯片立即涂上提前配制的质量分数为 60% 的 AMD 水溶液, 并于湿盒中放置 12 h, 超纯水冲洗后 N_2 吹干。配 100 mg/mL 的 2, 4-D/二甲基甲酰胺(DMF) 溶液, 以每 10 μ L 溶液加入 1 μ L 的量向溶液中加入 DIC, 然后将混合液滴加到芯片表面, 在 DMF 湿盒中放置 10 h 后, 依次用 DMF、超纯水冲洗表面, N_2 吹干。

2.3 蛋白质的荧光标记

Cy5 5 荧光染料标记抗体采用水相碳二亚胺法, Cy5 5 染料分子带有高活性的 NHS 基团, 它能够与抗体蛋白分子中的自由氨基发生高效反应。标记后的抗体分子带有 2~4 个荧光分子, 其实际标记比可以通过实验条件进行控制。具体的实验步骤请参考文[10]。

2.4 芯片测定

2.4.1 芯片性质测定

为了考察免疫芯片对蛋白的非特异性吸附和对 2, 4-D 抗体的特异性反应, 取 Cy5 5 标记好的 BSA 和 2, 4-D 抗体, 用 PBS 分别配成 4 mg/mL 和 0.1 mg/mL 的原液, 2, 4-D 抗体溶液用 PBS 稀释成一系列的浓度, 然后与 2 mg/mL 的 OVA 溶液按体积比为 1:9 的比例混合, 混合液通过流动进样器进样并记录系统响应。一个测量周期结束后, 用 pH 1.9、2 mg/mL 的 Pepsin 溶液对芯片进行活化 4 min, 再用有机溶液(V (乙腈)· V (丙酸)· V (水) = 50:1:50) 冲洗。

2.4.2 芯片稳定性测定

PBS 配制 1.5 μ g/mL 的 2, 4-D 抗体溶液, 与 2 mg/mL 的 OVA 按体积比为 1:9 的比例混合, 混合后样品的 2, 4-D 质量浓度为 0.15 μ g/mL, 通过流动进样器进样, 样品平行测定 20 次。

3 试验结果与讨论

3.1 免疫芯片对 BSA 的非特异性吸附

信号最大值减去基线值作为此次测量的有效值时, 可以得到 4 种 AMD 修饰的免疫芯片对 0.4 mg/mL 惰性蛋白 BSA 的非特异性吸附值。为了比较, 将芯片对浓度为 0.2 μ g/mL 的 2, 4-D 抗体的特异性响应也列出。从图 4 可见, 4 种免疫芯片对高浓度 BSA 的非特异性吸附信号均低于 100 nA, 同时对低浓度抗体的响应均高于 450 nA, 特异性响应与非特异性吸附的信号比值均大于 9, 则环氧基硅烷化试剂加氨基葡聚糖修饰的免疫芯片能够有效地抑制

蛋白质的非特异性吸附。当抗体和 BSA 浓度一致时, 两者的信号比值将超过 3 个数量级, 非特异性吸附不会对免疫检测造成影响。

氨基葡聚糖分子具有很强的亲水性, 它基本不对蛋白质产生吸附作用。由其修饰后的基片表面形成了一层结构致密的葡聚糖分子层, 能够有效地阻断蛋白质与基片的直接接触。从而抑制蛋白质的非特异性吸附。

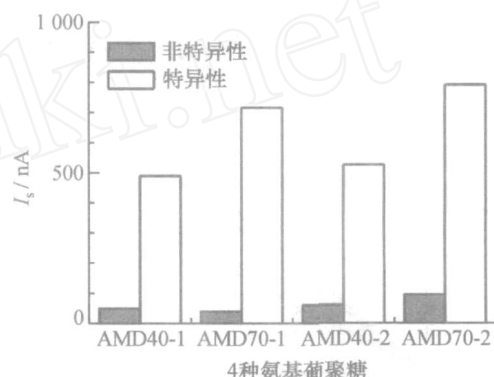


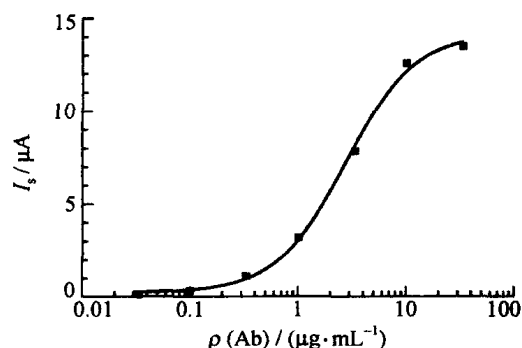
图 4 4 种免疫芯片对 BSA 和抗体的响应比较

3.2 免疫芯片对 2, 4-D 抗体的特异性响应

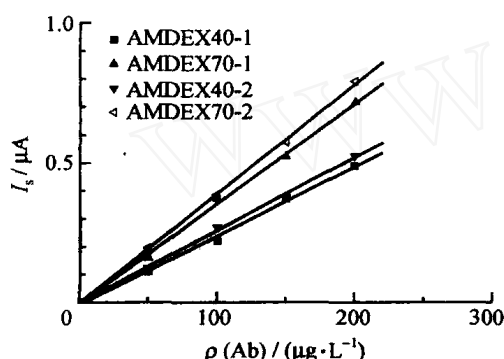
2, 4-D 抗体浓度变化范围较大时, AMD70-2 号葡聚糖修饰的免疫芯片对抗体的响应如图 5a 所示, 系统测量有效值与抗体浓度的关系符合 Logistic 方程, 其他 3 种免疫芯片试验结果类似。以 IC_{50} 表示系统测量有效值为最大值的一半时的抗体浓度, A_0 表示信号最大值, 可得 IC_{50} 值等于 2.71 μ g/mL, A_0 值等于 14.2 μ A。可见此芯片对抗体有很强的特异性响应, 原因是 AMD 分子内部含有丰富的活性氨基, 能够固定大量的 2, 4-D, 制备的免疫芯片具有高载量的性质, 同时, AMD 分子在水溶液中能够形成立体网状结构, 抗体分子能够在芯片表面形成多层蛋白质结构。进一步考察 4 种免疫芯片对低浓度抗体的响应, 如图 5b 所示, 可见抗体在低浓度范围变化时, 芯片响应与抗体浓度成正比, 其中 AMD70-2 修饰的芯片线性斜率最大, 它对抗体响应最灵敏。AMD 的相对分子质量越大, 氨基摩尔比越大, 其修饰的芯片对抗体响应灵敏度越大。原因是相对分子质量较大和氨基摩尔比较大的 AMD 分子内部含有更多的活性氨基, 其修饰的免疫芯片能够固定更多的目标物质分子, 与抗体的响应也更灵敏。因此葡聚糖的氨基摩尔比是影响免疫芯片灵敏度的重要因素。

3.3 芯片稳定性

AMD70-2 修饰的免疫芯片对 0.2 μ g/mL 的 2,



(a) AMEX70-2修饰的免疫芯片对抗体的响应曲线



(b) 4种免疫芯片对低浓度抗体的响应曲线

图5 免疫芯片对抗体的响应曲线

4-D 抗体的连续测定结果如图6所示,其他3种芯片的试验结果类似。由图可见,20次平行测量中信号有效值的波动不大,其中最大响应信号约为700 nA,最小响应信号约为640 nA。20次测量的信号平均值为668.0 nA,最大和最小响应信号与平均值的差都约为30 nA,它是信号平均值的4.5%,则平行测定中有效信号的相对误差都小于5%。这组数据的标准偏差是19.75 nA,相对标准偏差为0.03,也在5%以内,则环氧基硅烷化试剂加氨基葡聚糖的修饰方法制备出的免疫芯片具有很高的稳定性,用2 mg/mL、pH 1.9的Pepsin溶液活化后能够重复使用。根据前20次试验的结果,保守预测免疫芯片可重复使用100次以上。

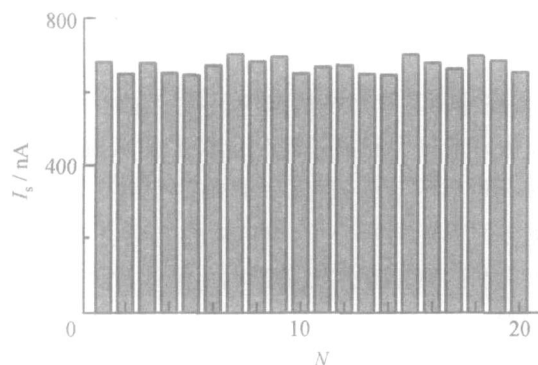


图6 免疫芯片连续测定20次的信号有效值

4 结 论

针对环境监测和食品安全检测领域中目标物质分子量较小的特点,本文研究了光学免疫传感器中带有小分子目标物质的免疫芯片的制备方法。结果表明,环氧基硅烷化试剂加氨基葡聚糖的修饰方法制备出的免疫芯片能够有效地抑制惰性蛋白质的非特异性吸附,并对目标物质的抗体具有很强的特异性响应。葡聚糖分子内氨基摩尔比的增加能够有效地提高免疫芯片的响应灵敏度。芯片具有很高的稳定性,能够重复使用100次以上。因此,本研究中制备的免疫芯片具有高载量、高稳定性、非特异性吸附小等特点。

参考文献 (References)

- [1] Scognamiglio V, Staiano M, Rossi M, et al. Protein-based biosensors for diabetic patients [J]. *J Fluorescence*, 2004, 14(5): 491 - 498.
- [2] Kronick M, Little W. A new immunoassay based on fluorescence excitation by internal reflection spectroscopy [J]. *J Immunol Methods*, 1975, 8: 235 - 242.
- [3] Mouvet C, Harris R D, Maciag C, et al. Determination of simazine in water samples by waveguide surface plasmon resonance [J]. *Analytica Chimica Acta*, 1997, 338: 109 - 117.
- [4] Ahmed F E. Analyses of pesticides and their metabolites in foods and drinks [J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 2001, 20(11): 649 - 661.
- [5] Joos B, Kuster H, Cone R. Covalent attachment of hydridizable oligonucleotides to glass supports [J]. *Anal Biochem*, 1997, 247: 96 - 101.
- [6] Henke L, Piunno P, McClure A, et al. Covalent immobilization of single-stranded DNA onto optical fibers using various linkers [J]. *Anal Chim Acta*, 1997, 344: 201 - 203.
- [7] Yakovleva J, Davidsson R, Bengtsson M, et al. Microfluidic enzyme immunosensors with immobilized protein A and G using chemiluminescence detection [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2003, 19: 21 - 34.
- [8] Floor M, Hofsteede L P M, Groenland W P, et al. Preparation and calcium complexation of oxidized polysaccharides [J]. *Recueil des travaux chimiques des Pays-Bas*, 1989, 108: 384 - 392.
- [9] Yalpani M, Brooks D E. Selective chemical modifications of dextran [J]. *J Polymer Science, Polymer Chemistry Edition*, 1995, 23: 1395 - 1405.
- [10] Claudia B, Andreas B, Guenter G. Optical multiple-analyte immunosensor for water pollution control [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2002, 17: 289 - 295.